

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV

**BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI, METABOLIZMUS A VÝZNAM
SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV RASTLÍN**

Diplomová práca

Študijný program:	Udržateľné poľnohospodárstvo a rozvoj vidieka
Študijný odbor:	6.1.1 všeobecné poľnohospodárstvo
Školiace pracovisko:	Katedra Fyziológie rastlín
Školiteľ:	doc. Ing. Katarína OLŠOVSKÁ, PhD.

Nitra 2010

Bc. Daniela Sýkorová

ABSTRAKT

Sýkorová Daniela: Biologické vlastnosti, metabolizmus a význam sekundárnych metabolitov rastlín: (Diplomová práca) – Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov; Katedra fyziológie rastlín. – Vedúca diplomovej práce: doc. Ing. Katarína OLŠOVSKÁ, PhD. – Nitra, 2010 - 79 s.

Cieľom diplomovej práce bolo komplexné spracovanie poznatkov z vedeckých a odborných publikácií týkajúcich sa problematiky sekundárnych metabolitov, konkrétne rastlinných alkaloidov a ich využitie vo fytofarmácii. Bližšie sme sa zaoberali alkaloidom taxol získavaný z tisu. Alkaloidy sú rastlinné dusíkaté heterocyklické zlúčeniny, ktoré sa voľne nevyskytujú. Mnohé sekundárne metabolity sa používajú v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle, iné sekundárne metabolity s biocídnym účinkom voči fytopatogénom je možné využiť namiesto klasických agrochemikálií. Existuje mnoho druhov alkaloidov s rôznymi účinkami. Najznámejšie sú tie s ktorými sa najčastejšie stretávame. Či už ide o poľnohospodársky a ekonomický (Mak siaty, Tabak virgínsky), alebo historický (Durman obyčajný, Blen čierny) význam. Z hľadiska využiteľnosti alkaloidov nie sú poľnohospodárske rastliny veľmi významné, pretože iba málo z nich sa oplatí využívať na takéto spracovanie. Využitie je hlavne v medicíne či bylinárstve, s čím súvisí aj ich ekonomický a historický význam. Využívali sa v bojoch, pri šamanstve, a samozrejme aj na liečiteľské účely. Jednou z takých rastlín je aj Tis západný (*Taxus brevifolia*), ktorý je najznámejším zdrojom širokého spektra sekundárnych metabolitov. Ihličky a kôra tisu obsahujú okrem jedovatých alkaloidov aj látku účinnú proti rakovine, ktorá sa nazýva taxol. Úsilie o syntetizovanie taxolu sú rozbehnuté a zvýšeniu zásob môže napomôcť kultivácia v pletivových kultúrach alebo pestovanie stromov. Klinické skúšky sú limitované vzácnosťou drogy. Progresívny vstup taxolu DEBAC (10-deacetylbaaccatinu) a jeho analógov do procesu tvorby antileukemických a protinádorových preparátov, podmienil rozpracovanie selekčných, pestovateľských a technologických podmienok využitia rastlinného druhu *Taxus baccata* L.

Kľúčové slová: sekundárne metabolity rastlín, biosyntéza, význam, alkaloidy, *Taxus baccata*, taxol

ABSTRAKT

Sýkorová, Daniela: *Biological properties, metabolism and the importance of plant secondary metabolites*, (Diploma work Slovak agricultural university in Nitra. Faculty of agrobiolgy and food resources, Chair of plant physiology – Leader of the diploma work: doc. Ing. Katarína Olšovská, PhD. – Nitra, 2010 – 79 pp.

The aim of the diploma work was to process the knowledge of scientific researches dealing with the problems of secondary metabolites, in particular plant alkaloids and their use in phytopharmacy. We dealt with the alkaloid taxol received by yew-tree. Alkaloids are plant nitrogenous heterocyclic compounds which do not occur freely in nature. Many secondary metabolites are used in food, pharmacy and cosmetic industry, another secondary metabolites are able to be used instead of classic agricultural chemicals. There are many existing alkaloids with various levels of effects. The most well-known are those, which we generally meet in an ordinary life – either of agricultural – (poppy seed, tobacco) or historical importance (stramonium). From the point of view of use of alkaloids, agricultural plants are not very important, because just few of them are worth to use and to process. The use of them is mainly in medicine or herbal use, which is connected with their economical and historical importance. They were used in battles, and of course for curing purposes. One of those plants is *taxus brevifolia*, which is the most important source of wide scale of secondary metabolites. Spicules and bark, except of toxic alkaloids, also consist of matter called taxol, which is effective against cancer. There already is an effort of taxol synthesis and cultivation of telary cultures or growing trees can help to increase the supplies of it. Clinic exams are limited because of its rareness. Progressive input of taxol DEBAC (10deacetylbaaccatin) and their analogues to the process of creation of antileucemia and antioncogenous preparations conditioned processing of selective, growing and technologic conditions of use of *taxus baccata* L.

Key words: plant secondary metabolites, biosynthesis, role, alkaloids *taxus baccata*, taxol

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Daniela Sýkorová vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému „Biologické vlastnosti, metabolizmus a význam sekundárnych metabolitov rastlín.“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre, 16. 04. 2010

.....

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcel poďakovať vedúcej záverečnej práce, pani doc. Ing. Kataríne OLŠOVSKÉJ, PhD. a taktiež pani Ing. Angelike FILOVEJ, PhD., za ochotu pri poskytovaní cenných rád a pokynov, za odborné vedenie a pripomienky, ktorými mi ochotne pomáhali pri vypracovaní záverečnej práce. Zároveň ďakujem svojim rodičom za nesmiernu podporu pri štúdiu na univerzite.

OBSAH

OBSAH.....	6
ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK	8
1 ÚVOD	10
2 PREHĽAD LITERATÚRY	11
2.1 Význam a využitie sekundárnych metabolitov v rastlinnej produkcii	
i v rôznych oblastiach spoločenskej praxe	11
2.2 Vznik a význam primárnych a sekundárnych metabolitov rastlín.....	15
2.2.1 Energetický metabolizmus	15
2.2.1.1 Fotosyntéza	16
2.2.1.2 Biologická oxidácia substrátov (respirácia).....	18
2.2.2 Metabolizmus sacharidov	20
2.2.3 Metabolizmus lipidov.....	22
2.2.4 Metabolizmus aminokyselín.....	23
2.2.5 Metabolizmus nukleotidov.....	24
2.2.6 Metabolizmus, biologické vlastnosti a význam primárnych a	
sekundárnych zlúčenín v rastlinách.....	25
2.2.6.1 Alkaloidy.....	26
2.2.6.2 Terpenoidy.....	27
2.2.6.3 Flavonoidy.....	27
2.2.6.4 Fytoalexíny.....	28
2.2.6.5 Fenoly.....	29
2.2.6.6 Glykozidy.....	29
2.2.6.7 Steroidy.....	29
2.2.7 Cesty biosyntézy sekundárnych metabolitov v rastlinách a faktory	
ovplyvňujúce ich produkciu	31
2.2.7.1 Vonkajšie faktory produkcie sekundárnych metabolitov	33
2.2.7.2 Vnútorne faktory produkcie sekundárnych metabolitov rastlín.....	36
2.3 Alkaloidy	39
2.3.1 Využitie alkaloidov v humánnej medicíne a farmaceutizme	39
2.3.2 Prečo rastliny tvoria alkaloidy?	43
2.3.3 Klasifikácia alkaloidov	46

2.3.4	Druhové zastúpenie rastlín produkujúcich alkaloidy	52
2.3.4.1	Tis	52
2.3.4.2	Časová a priestorová produkcia taxánov	59
2.3.4.3	Získavanie a využitie taxolu	60
2.4	Nové technológie v produkcii sekundárnych metabolitov	63
2.4.1	Explantátové techniky	63
2.4.2	Bunkové kultúry	65
2.4.3	Orgánové kultúry	66
3	CIEĽ PRÁCE.....	68
4	MATERIÁL A METÓDY	69
5	ZÁVERY	70
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	71
7	PRÍLOHY	77

Zoznam skratiek a značiek

tab. – tabuľka

napr. – napríklad

č. – číslo

tzv. – takzvané

t.j. – to jest

atď. – a tak ďalej

kol. – kolektív

m – meter

mm – milimeter

nm – nanometrov

kg – kilogram

°C - celziov supeň

UV žiarenie – ultrafialové žiarenie

TBC – tuberkulóza

pH - exponent kyslosti

CO₂ – oxid uhličitý

H₂O – voda

H – vodík

O – kyslík

C – uhlík

Mn – mangán

Fe – železo

N – dusík

DEBAC – deacetylbaecatin

GalNAc – N-acetylgalaktózamínu

THF – tetrahydrofolátu

LSD – dietylamid kyseliny lysergovej

KIN – kinetín

BAP – benzylaminopurín

2,4-D – kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová

NAA – kyselina α -naftyloctová

IAA – kyselina γ -indolyloctová

PFK – fosfofruktokináza
PEPCK – P-Pyr-karboxykináza
CoA – koenzým A
DMT – Dimethyltryptamín
NAD⁺ – nikotínamidadenínindinukleotid
FAD – flavínadenínindinukleotid
GTP – guanosyntřifosfát
GDP – guanosyndifosfátu
DNA – deoxyribonukleová kyselina
RNA – ribonukleová kyselina
tRNA – transferová ribonukleová kyselina

1 ÚVOD

V rastlinách sa nachádza veľké množstvo sekundárnych metabolitov, ktoré sú prítomné v oveľa menších množstvách ako primárne metabolity. Medzi sekundárne metabolity patria alkaloidy, terpény, fenolové látky, steroidy a flavonoidy. Mnohé sekundárne metabolity nájdené v rastlinách majú úlohu pri obrane rastlín pred patogénmi, škodcami, herbivormi, pri ochrane pred UV žiarením, pri pigmentácii a opelení. Úloha väčšiny sekundárnych metabolitov je neznáma. Odhaduje sa, že v rastlinách sa nachádza približne 100 000 zlúčenín a každý rok sa zoznam rozširuje o ďalšie. Mnohé sekundárne metabolity sa používajú v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle, iné sekundárne metabolity s biocídnym účinkom voči fytopatogénom je možné využiť namiesto klasických agrochemikálií.

Medzi najdôležitejšie sekundárne metabolity sa zaraďujú farmaceutické látky. Približne 85 % tradičných liečiv obsahuje extrakty z rastlín. Väčšina firiem vo farmaceutickom priemysle je závislá od divo rastúcich rastlín, z ktorých sa extrakciou získavajú medicínsky dôležité látky. Mnohé liečivé rastliny sú vážne ohrozené urbanizáciou, odlesňovaním, znečisťovaním životného prostredia, zavádzaním nepôvodných rastlín do prírody a inými faktormi.

Už v staroveku sa poznala nielen liečivá sila, ale aj jedovatosť niektorých rastlín. Spočiatku sa rastlinné jedy používali na trávenie divej zveri. Dnešné poznatky o jedovatých rastlinách sú podstatne širšie a hlbšie. Aj v našom zemepisnom pásme rastú desiatky rastlinných druhov, ktoré môžu zapríčiniť nebezpečné otravy. Ťažko je jednoznačne určiť, kedy možno rastlinu považovať za skutočne jedovatú. Najčastejšie obsahujú rastliny len viac alebo menej známu látku, ktorá môže ľudskému organizmu škodiť, keď sa nejakým spôsobom a v nevhodnej dávke dostane do tela. Otravy jedovatými rastlinami nie sú veľmi časté, ak odhliadneme od detských otráv zapríčinených plodmi, jadrami alebo kvetmi niektorých zelených rastlín.

Jedným z jedovatých ihličnatých kultivarov je tis (*Taxus*), ktorý obsahuje niekoľko alkaloidov horkej chuti, ktoré sú prudko, až smrteľne jedovaté.

2 PREHĽAD LITERATÚRY

2.1 VÝZNAM A VYUŽITIE SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV V RASTLINNEJ PRODUKCII I V RÔZNYCH OBLASTIACH SPOLOČENSKEJ PRAXE

Metabolity, ktoré majú pre bunku základný význam a sú nevyhnutné na udržanie životných procesov sa označujú ako primárne metabolity (v rastlinách sú to nukleové kyseliny, bielkoviny, sacharidy, lipidy, hormóny, pigmenty fotosyntézy - chlorofyly a karotenoidy a pod.) Rastliny syntetizujú a akumulujú aj ďalšie sekundárne metabolity, ktoré sa vyznačujú rôznorodosťou chemických štruktúr, obmedzeným rozšírením a ochrannou funkciou pre organizmus. Počtom látok najvýznamnejšie skupiny sekundárnych metabolitov sú terpény, fenolové látky a z dusíkatých látok najmä alkaloidy (MASAROVÍČOVÁ, REPČÁK, 2002).

Väčšinou sú súčasťou adaptačných pochodov pre interakciu rastliny s prostredím. Zistilo sa, že viacero sekundárnych metabolitov nájdených v rastlinách, má význam pri obrane organizmu proti herbivorom, škodcom a patogénom, pri ochrane pred UV žiarením (BENNET, 1994).

Pre ich mnohé biologické účinky ich možno uplatniť rôznymi spôsobmi. Môže ísť o využitie v potravinárskom priemysle vo forme aditív ako nutraceutík a preventívnomedicínskych prípravkov. Uplatnenie majú aj vo farmaceutickom priemysle, kde slúžia na výrobu preparátov, ktoré obsahujú tieto látky ako terapeuticky účinné substancie. Sekundárne metabolity niektorých druhov rastlín vykazujú biocídny účinok voči fytopatogénom spôsobujúcich škody na poľnohospodárskych a záhradných plodinách. To umožňuje ich využitie namiesto klasických agrochemikálií, pretože ich nadmerné používanie spôsobuje kontamináciu pôdy a následne aj potravinového reťazca. Produkcia sekundárnych metabolitov ponúka veľký priestor využívaniu biotechnologických postupov. Napríklad mak siaty sa pestuje ako poľná plodina. Hospodárskym produktom je modré alebo biele semeno obsahujúce okolo 50 % oleja, ktoré sa spotrebováva v kuchyni, v cukrárstve a v pekárniach, a získava sa z neho olej. Suché prázdne makovice sú dôležitou surovinou farmaceutického priemyslu, nakoľko sa z nich využívajú alkaloidy (hlavne morfium a kodein), potrebné k výrobe liekov. Na záhradách sa mak tiež pestuje pre semeno, ale aj ako dekoratívna rastlina. Ide teda o rastlinu rôzneho úžitku – potravinovú, olejodárnu, farmaceutickú (liečivú) a dekoratívnu. A pritom je stále rastlinou jedovatou a omamnou.

Pri hodnotení úžitkovosti jedovatých rastlín, ich významu pre človeka, jednoznačne prevláda využitie v odbornom lekárstve a v ľudovom liečiteľstve. Táto úžitková stránka jedovatých rastlín zasahuje až do hlbokého dávneho ľudstva. Človek v prírode vyhľadával potravu i prostriedky zmierňujúce jeho bolesti spôsobené chorobami či zraneniami. Dnes sa snažíme získať čo najkvalitnejšiu drogu. Veľa jedovatých bylín a drevín sa vysadzuje do záhradiek, záhrad, parkov, do verejnej zeleni miest a sídlisk. Jedovaté rastliny sa bežne pestujú ako interiérové rastliny v domácnostiach, úradoch, predajných halách a podobne. Veľa jedovatých rastlín môžeme označiť ako jedovaté rastliny technické. Ľan a konope poskytujú prírodné vlákna. Niekoľko druhov jedovatých rastlín sa u nás pestuje pre využitie dreva k truhlárskym, rezbárskym a sústružníckym prácam. .

Semená ľanu, konope, maku a niektorých ďalších jedovatých rastlín poskytujú kvalitné oleje používané k farmaceutickým, technickým a iným účelom. A hoci sa to môže zdať podivné, sú medzi jedovatými rastlinami i druhy poskytujúce potravinové suroviny. Najdôležitejšie sú zemiaky. Jedovaté sú tiež semená marhúľ a broskýň i keď ich čerstvé plody obsahujú čerstvé vitamíny. Existuje tiež niekoľko jedovatých rastlín, ktorých mladé listy, kvety alebo plody sa používali a miestami ešte používajú k príprave šalátov a polievok. Nemaľý úžitok majú tiež rastliny medonosné. Nektár včelám poskytujú napríklad kvety náprstníku, prvosienky, trnovníku, sasanky, maku a iné (NOVÁK, 2007).

Sekundárne metabolity sa syntetizujú v rastlinách aj na ochranu proti fytofágnemu hmyzu. Repelenty a antifeedanty odpudzujú hmyz. Naopak, atraktanty sa uplatňujú pri reprodukcii rastlín ako pigmenty, vône, zložky nektáru a peľu vo vzťahu k opel'ovačom. Pigmenty umožňujú optickú komunikáciu medzi rastlinami a živočíchmi (signálna funkcia pigmentov kvetov, semien a plodov) (MASAROVICHOVÁ, REPČÁK, 2002).

Ďalší pohľad na sekundárne metabolity je, že sekundárne metabolity sú vhodné pre uloženie prebytočného uhlíka a dusíka z primárneho metabolizmu. Sekundárne metabolity sú neskôr odbúrané a uskladnený uhlík a dusík je recyklovaný v primárnom metabolizme, kde vznikla požiadavka. Medzi primárnym a sekundárnym metabolizmom je dynamická rovnováha, na ktorú má vplyv rast, diferenciácia pletív a vývoj rastlinného tela (COLLIN, 2000).

Tie faktory, ktoré určujú lokalizáciu a akumuláciu sekundárnych metabolitov v intaktnej rastline, sú dôležité aj pre rastlinné pletivové kultúry. Napríklad, na stimuláciu tvorby sekundárnych metabolitov (fytoalexínov) v pletivových kultúrach sa využívajú zlúčeniny biologického pôvodu - biotické elicítory. Mnohé sekundárne metabolity majú veľký význam pre nás, spotrebiteľov, keďže tvoria základ arómy, príchutí a zafarbenia potravín, korenia a nápojov. Sekundárne metabolity majú mnohé biologické účinky, ktoré je možné uplatniť

rôznymi spôsobmi v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Našli svoje uplatnenie pri liečení rôznych chorôb (tab. č.1), ako aditíva do potravín (tab. č.2). Iné sekundárne metabolity (napr. fytoalexíny) s biocídnym účinkom voči fytopatogénom je možné využiť namiesto agrochemikálií.

Najhodnotnejšími sekundárnymi metabolitmi sú farmaceutiká. Ich produkcia je často limitovaná nedostupnosťou rastlinných zdrojov. Sekundárne metabolity sa v rastlinách často nachádzajú v nízkych koncentráciách. (*Catharanthus roseau*) produkuje významné indolové alkaloidy v malých množstvách. Tieto produkty sú medicínsky dôležité a zahŕňajú protirakovinové liečivá - vinblastín a vinkristín ako aj ajmalicín, ktorý sa používa v liečbe porúch obehovej sústavy. Prvé dva produkty sú extrémne drahé a môžu byť izolované len z rastlín v malých množstvách. Dráha syntézy je veľmi dlhá a zahŕňa 20 enzýmových krokov. Chemická syntéza nie je reálna (COLLIN, 2000).

Výskyt sekundárnych metabolitov vo veľmi nízkych koncentráciách a často pri ohrozených druhoch viedol k snahe o ich produkciu alternatívnymi spôsobmi. Biotechnologické metódy rastlinných explantátových kultúr poskytujú obnoviteľný zdroj pre produkciu sekundárnych metabolitov. Boli vyvinuté systémy pre produkciu sekundárnych metabolitov v kalusových, bunkových suspenzných, koreňových a výhonkových kultúrach. Predpokladom pre komerčnú aplikáciu týchto systémov je selekcia vysoko produktívnych bunkových línií ako aj optimalizácia chemického a fyzikálneho prostredia kultivácie buniek pre maximalizáciu produkcie.

Tabuľka č.1 Rastlinné zdroje vybraných sekundárnych metabolitov a ich účinok (RAO et al, 1988)

Sekundárny metabolit	Účinok	Rastlinný zdroj
Berberín	protektívny	<i>C. japonica</i>
Codeín	sedatívny	<i>P. somniferum</i>
Digoxín	stimulačný pre činnosť srdca	<i>Di. lanata</i>
Morfín	sedatívny	<i>P. somniferum</i>
Chinín	antimalárny	<i>Cinchon.ledgeriana</i>
Šikonín	antibakteriálny	<i>L. erythrorhizon</i>
Taxol	antikancerogénny	<i>Taxus brevifolia</i>
Vinkristín	antileukemický	<i>Cath. roseus</i>
Vinblastín	antileukemický	<i>Cath. roseus</i>
Ajmalicín	antihypertenzný	<i>Cath. roseus</i>
Antitermisin	antimalárny	<i>Artemisia annua</i>
Podofylotoxín	protinádorový	<i>Podophyllum petalum</i>
Diosgenín	steroidný prekurzor	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Elipticín	protinádorový	<i>Orchrosia elliptica</i>
Forskolín	antiglaukomový	<i>Colues forskolii</i>

Tabuľka č.2 Potravinové aditíva získané z rastlinných bunkových kultúr
(RAO et al, 2002)

Aditívum		Rastlinný zdroj
Farbivá	antokyaníny	<i>Vitis vinifera, Euphorbia spp., Datura carota, Peoana frutescens</i>
	betalaníny	<i>Beta vulgaris, Chenopodium rubrum</i>
	karotenoidy	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Príchute	Vanilín	<i>Vanilla planifolia</i>
	Cesnak	<i>Allium sativum</i>
	Cibuľa	<i>Allium cepa</i>
	Citrón	<i>Citrus spp.</i>
	Kakao	<i>Theobroma cacao</i>
	kapsaicín	<i>Capsicum frutescens</i>
	Stladiá	Steviosín
Esenciálne oleje	glycyrizín	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
	thauMATIN	<i>Thaumatococcus danielli</i>
	mätový	<i>Mentha piperata</i>
	kamilkový	<i>Matricaria chamomilla</i>
	jazmínový	<i>Jasmine officinale</i>
	Anízový	<i>Pimpinella anisum</i>

2.2 VZNIK A VÝZNAM PRIMÁRNYCH A SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV RASTLÍN

K najzákladnejším vlastnostiam rastlinného organizmu patrí vysoko účelová organizovanosť procesov, ktoré v ňom prebiehajú. Jedná sa hlavne o komplex biochemických reakcií, ktoré zabezpečujú príkon energie pre rastlinu, ako i syntézu všetkých potrebných látok pre fyziologické procesy. Sú enzymaticky riadené a katalyzované a súhrnne sa nazývajú metabolizmus alebo látková premena. Základom rastlinného metabolizmu sú asimilačné (anabolické) a disimilačné (katabolické) procesy prebiehajúce v bunkách súbežne a za vzájomného ovplyvňovania. Z praktického hľadiska sa u rastlín rozlišuje metabolizmus primárny (základný) a metabolizmus sekundárny (špecializovaný), pričom medzi nimi nie je možné stanoviť presnú hranicu (POLLOCK, FARRAR, GORDON, 1992; PROCHÁZKA et al., 1998; SMIRNOFF, 1995).

2.2.1 Energetický metabolizmus

Zásadným javom rastlinného metabolizmu je pohlcovanie slnečnej energie, jej transformácie na energiu chemických väzieb, čo je proces syntetický – asimilačný. Uplatňujú sa pri ňom tzv. základné substráty s malým obsahom voľnej energie (voda, oxid uhličitý), z nich sa budujú substráty – sacharidy a lipidy s veľkým obsahom voľnej energie. Celá reakcia sa nazýva fotosyntéza, pre ktorú je zdrojom energie, ako je vyššie uvedené, slnečné žiarenie. Pri disimilácii dochádza k rozkladným respiračným pochodom, pričom z látok energeticky bohatých vznikajú látky energeticky chudobné. Uvoľnená energia sa využíva k rôznym fyziologickým procesom. Významnými procesmi metabolizmu rastlín, ktorý je geneticky zakódovaný, sú teda fotosyntéza a respirácia.

Primárny metabolizmus zahŕňa procesy nutné pre zabezpečenie energie a stavebných materiálov, teda procesy syntézy základných stavebných zložiek organizmu. Látky označované ako primárne sú zlúčeniny, ktoré sa vždy a vo všetkých formách živej hmoty podieľajú na primárnom metabolizme. Produkty primárneho metabolizmu bývajú u organizmov v podstate rovnaké a patria k nim predovšetkým cukry, aminokyseliny, proteíny, tuky a iné. Tieto primárne látky sú nevyhnutné pre základné životné pochody rastlín a zúčastňujú sa základných biochemických reakcií (POLLOCK, FARRAR, GORDON, 1992; PROCHÁZKA et al., 1998; SMIRNOFF, 1995).

2.2.1.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza predstavuje súbor reakcií prebiehajúcich v chloroplastoch zelených rastlín, ktorými sa premieňa voda a oxid uhličitý s využitím slnečnej radiácie na sacharidy. Ako vedľajší produkt sa uvoľňuje kyslík. Proces fotosyntézy sa skladá z dvoch typov reakcií:

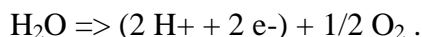
1. reakcie, ktoré priamo závisia od svetelnej energie (tzv. svetelná fáza)
2. reakcie, ktoré môžu prebiehať za tmy (tzv. tmavá fáza)

Svetelná fáza fotosyntézy: v tejto fáze fotosyntézy sa energia slnečného žiarenia premieňa na energiu chemickú, ktorá sa akumuluje v zlúčeninách bohatých na energiu. Uskutočňuje sa v dvoch pigmentových systémoch: vo fotosystéme I, v ktorom je aktívnym chlorofyl a, kt. absorbuje fotóny s vlnovou dĺžkou 700 nm (označuje sa P700) a vo fotosystéme II, ktorý obsahuje molekuly chlorofylu a aj b. Ich absorpčné maximum je asi 680 nm (P680). Chlorofyly oboch systémov sú viazané na nosičové bielkoviny. Podstatou tejto fázy fotosyntézy je absorpcia fotónov slnečného žiarenia molekulami chlorofylu (zelené farbivo rastlín). Prostredníctvom týchto "zberačov" je zhromaždená energia prenesená na molekulu chlorofylu a v tzv. reakčnom centre, čím sa dostane do excitovaného (vzbudeného) stavu. Základom tejto premeny je prechod do hladiny s vyššou energiou. Elektrón obohatený o energiu fotónu prijme od excitovanej molekuly aktívneho chlorofylu najbližší prenášač. Prijatím elektrónu sa ionizuje aj molekula prenášača (prijatím elektrónu sa redukuje a odovzdaním oxiduje). Primárny akceptor môže ďalej odovzdávať elektróny na ďalšie prenášače (redoxné systémy), ktoré sú usporiadané do reťazca. Prenosom elektrónov na nižšiu energetickú hladinu dochádza k postupnému uvoľneniu energie, ktorá sa využíva na tvorbu ATP. Pretože pri fotosyntéze je prenos elektrónov, pri ktorom vzniká ATP, vyvolaný absorpciou fotónu dopadajúceho na chlorofyl, nazýva sa tento dej získavania energie fotofosforylácia. Prebieha dvoma spôsobmi - cyklicky a necyklicky.

Cyklická fotofosforylácia: pri tomto procese sa molekuly chlorofylu P700 fotosystému I excitujú absorbovanými fotónmi slnečného žiarenia. Excitované elektróny sú prenášané na feredoxín cez komplex cytochrómov "b" a "f" a plastochinón späť na molekulu P700, ktorá sa tak regeneruje do pôvodného (redukovaného) stavu.

Necyklická fotofosforylácia: pri tomto procese spolupracujú oba fotosystémy I a II. P680 ožiarením prejde do excitovaného stavu. Akceptorom je látka povahy karotenoidov (označovaná symbolom Q). Elektróny sú prenášané cez systém prenášačov a zaplnia medzeru v molekule P700 fotosystému I, ktorý privedú do základného stavu. Uvoľnením elektrónov z excitovaného P680 a ich prechodom na P700 vznikne oxidovaná forma chlorofylu P680.

K jeho regenerácii do pôvodného stavu sa využíva fotolýza vody:



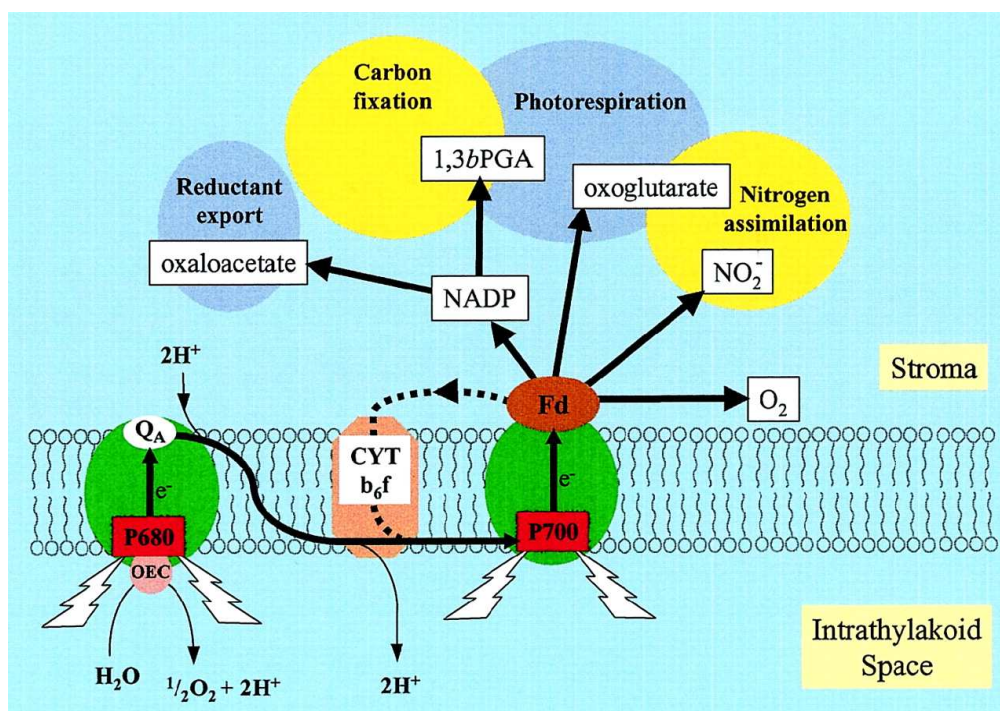
Kyslík uniká do vzduchu. Dva elektróny doplnia chýbajúce elektróny dvom ionizovaným molekulám P680 a dva protóny spolu s dvoma elektrónmi, ktoré sa uvoľnili z dvoch excitovaných molekúl P680 sa využívajú na redukciu NADP+ za vzniku NADPH.

Tmavá fáza fotosyntézy (Calvinov cyklus): v tejto fáze prebieha biosyntéza sacharidov z CO₂ za prítomnosti NADPH a ATP účinkom enzýmu ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázy. Má 3 zákl. stupne:

1. Fixácia CO₂: primárnym akceptorom CO₂ je ribulóza-1,5-bisfosfát. Vzniknutý produkt sa hydrolyticky štiepi na dve molekuly kyseliny 3- fosfoglycérovej. Pretože táto kyselina má vo svojej molekule tri atómy uhlíka, volajú sa rastliny, v ktorých sa takto ukladá uhlík C3 rastliny.

2. Redukcia kyseliny 3-fosfoglycérovej za vzniku hexózy: dve molekuly kyseliny fosfoglycérovej sa za účasti NADPH a ATP redukujú na glyceraldehyd-3-fosfát. Z jeho 1/6 sa syntetizujú sacharidy spätnými reakciami glykolózy a z 5/6 vzniká ribulóza-1,5-bisfosfát.

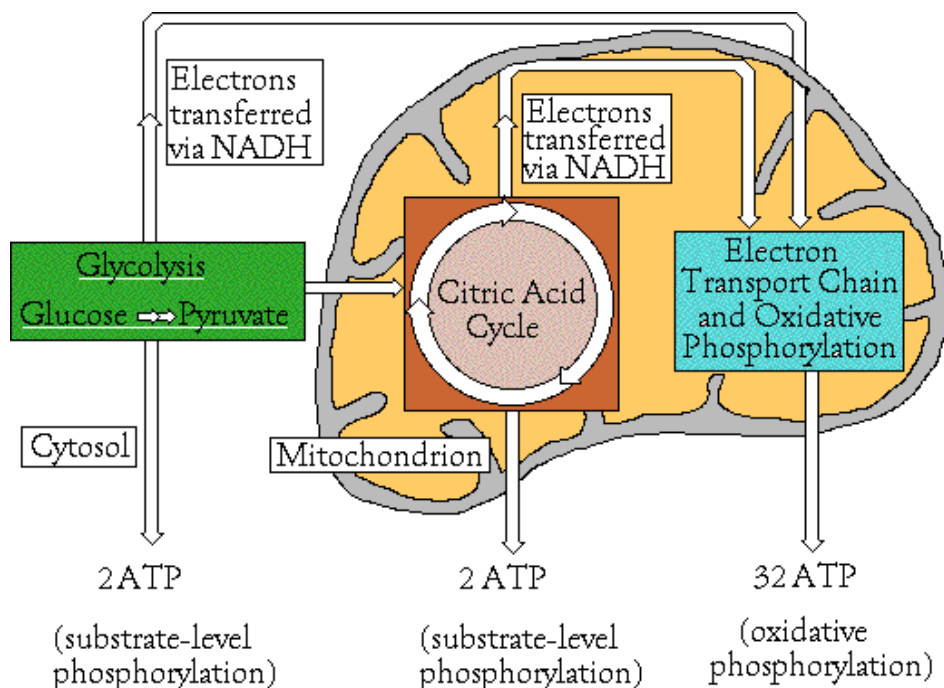
3. Regenerácia akceptora CO₂: tento stupeň tvorí súbor reakcií pentóзовého cyklu, zabezpečí tvorbu ribulóza-5-fosfátu (z ktorých za účasti ATP vzniká ribulóza-1,5-bisfosfát) a tak cyklus uzatvorí.



Obr. č.1 Schéma procesu fotosyntézy rastlín (svetlých aj temnostných rastlín) (<http://referaty-seminarky.sk/metabolizmus-sacharidov/>)

2.2.1.2 Biologická oxidácia substrátov (respirácia)

Pod pojmom respirácia sa v biochémií označuje proces, v ktorom bunky získavajú energiu rozkladom cukrov. Rozklad cukrov zahŕňa glykolýzu a Krebsov (citrátový) cyklus. Dýchanie všetkých eukaryotických organizmov prebieha v určených organelách, mitochondriách. Energia elektrónov z Krebsovho cyklu sa v mitochondriách využíva v tvz. (mitochondriálnom) dýchacom reťazci na tvorbu ATP a NADH.



Obr. č.2 Schéma biologickej oxidácie (respirácie) substrátov v živých bunkách

Glykolýza: predstavuje postupnosť 10 enzýmovo katalyzovaných reakcií, ktoré rozkladajú glukózu na dve molekuly kyseliny pyrohroznovej. Všetky prebiehajú v cytoplazme a enzýmy, ktoré ich katalyzujú, nie sú viazané na bunkové štruktúry. Celý proces môžeme rozdeliť na tri fázy:

1. Premena glukózy na glyceraldehyd-3-fosfát (vhodný donor vodíka) - glukóza sama nie je donorom vodíkových atómov, a preto musí byť aktivovaná dvojnásobnou fosforyláciou s ATP. Táto fáza zahŕňa 4 reakcie:

- fosforyláciu glukózy na glukóza-6-fosfát
- izomerizáciu glukóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát
- fosforyláciu fruktóza-6-fosfátu na fruktóza-1,6-bisfosfát
- štiepenie fruktóza-1,6-bisfosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetónfosfát. Do ďalšej fázy vstupuje len aldehyd, ale posúvaním rovnováhy odčerpaním glyceraldehyd-3-fosfátu zreaguje aj celý dihydroxyacetón.

2. Dehydrogenácia glyceraldehyd-3-fosfátu: je jediným oxidačným stupňom glykolýzy.

Vzniká kyselina fosfoglycérová.

3. Vznik kyseliny pyrohroznovej: táto fáza je ešte spoločná. Sledom reakcií sa z kyseliny fosfoglycérovej (za odštiepenia fosfátovej skupiny a jeho nadviazania na ADP, z ktorej vzniká ATP) stáva kľúčový metabolit - kyselina pyrohroznová. Ďalšie reakcie kyseliny pyrohroznovej závisia od podmienok a pôvodu organizmu. Za aeróbnych podmienok sa kyselina pyrohroznová mení oxidačnou dekarboxyláciou na acetylkoenzým, ktorý ďalej vstupuje do citrátového cyklu. Za anaeróbnych podmienok sa kyselina pyrohroznová redukuje na kyselinu mliečnu. Kvasinky za anaeróbnych podmienok premieňajú kys. pyrohroznovú dekarboxyláciou na acetaldehyd. Jeho redukciou vzniká etanol a tento dej nazývame alkoholové kvasenie (<http://referaty-seminarky.sk/metabolizmus-sacharidov/>).

Krebsov cyklus: (citrátový cyklus, cyklus trikarboxylových kyselín, alebo cyklus kyseliny citrónovej), je cyklická postupnosť reakcií odbúravania organických zlúčenín uhlíka (sacharidov) na CO_2 , pričom sa získavajú energeticky bohaté látky NADH, FADH_2 a ATP. V procese oxidatívnej fosforylácie sa za spotreby kyslíka môže získavať ATP aj z NADH a FADH_2 , prípadne sa tieto látky môžu využiť pri biosyntéze rôznych iných organických látok. Krebsov cyklus je konečnou fázou odbúravania intermediárnych produktov pri metabolizme cukrov, tukov a čiastočne bielkovín. Prebieha v mitochondriách.

Význam Citrátového cyklu: produkcia energeticky bohatých zlúčenín ATP, NADH a FADH_2 v Krebsovom cykle sa využíva pri biosyntéze mnohých organických látok. Krebsov cyklus však nemusí prebehnúť celý, ale jeho ktorýkoľvek medziprodukt môže byť východiskovou látkou (uhlíkovou kostrou, substrátom) pre syntézu mnohých organických zlúčenín, z ktorých snáď najdôležitejšia je tvorba aminokyselín.

Cyklus kyseliny citrónovej: produktom glykolýzy je pyruvát (kyselina pyrohroznová). V molekule pyruvátu je však uskladnené značné množstvo energie (spalné teplo mólu glukózy je približne 1700 kJ). Túto energiu však môže bunka uvoľniť len oxidáciou kyslíkom. Pyruvát prechádza z cytoplazmy do mitochondrií. Tam sa každá molekula pyruvátu prevedie na CO_2 a dvojuhlíkovú acetylovú skupinu, z ktorej po spojení s koenzýmom A (CoA) vznikne acetylkoenzým A (acetyl-CoA).

Acetylová skupina v acetyl-CoA je s koenzýmom A spojená väzbou s vysokým obsahom energie. Acetyl-CoA vstupuje do zložitého chemického reťazca nazývaného cyklus kyseliny citrónovej. V týchto reakciách sa acetylová skupina oxiduje na CO_2 za súčasnej tvorby veľkého množstva prenášačov elektrónov NADH. Nakoniec elektróny s vysokým obsahom energie prechádzajú z NADH reťazcom prenosu elektrónov vo vnútornej mitochondriovej

membráne. Tu sa energia, ktorá sa pri tomto procese uvoľňuje, používa na tvorbu ATP (za spotreby molekulárneho kyslíka). Práve v týchto posledných krokoch sa uvoľňuje veľké množstvo energie, a tým sa aj vytvára väčšina ATP. Tvorba ATP prebiehajúca v mitochondriách sa označuje ako oxidatívna fosforylácia. Úplným rozložením mólu glukózy bunky získa 38 ATP a časť energie sa uvoľní vo forme tepla (<http://www.gsurba.sk/pk/bio/texty/krebsovcyklus.pdf>)

2.2.2 Metabolizmus sacharidov

Medzi dôležité metabolické dráhy sacharidov patrí:

1. Glukoneogenéza

V jej priebehu sú prevádzané nesacharidové prekursori ako laktát, pyruvát, glycerol a aminokyseliny na glukózu. Glukoneogenéza využíva glykolytické enzýmy. Tri z týchto enzýmov, hexokináza, fosfofruktokináza (PFK) a pyruvátkináza, katalyzujú reakcie s veľkou zmenou voľnej energie v smere glykolýzy. V glukoneogenéze musia byť teda tieto reakcie nahradené reakciami umožňujúcimi termodynamicky výhodnú syntézu glukózy. V metabolizme glykogénu sa biosyntetické a degradačné dráhy líšia najmenej v jednej reakcii. To umožňuje nielen termodynamickú výhodnosť v oboch smeroch za rovnakých fyziologických podmienok, ale i nezávislú reguláciu oboch smerov, takže jeden smer môže byť aktivovaný, zatiaľ čo druhý je inhibovaný. Pyruvát je prevedený najprv na oxalacetát a potom na fosfoenolpyruvát. Vznik fosfoenolpyruvátu z pyruvátu je endergonický proces a vyžaduje teda voľnú energiu. Toto dosiahneme prevedením pyruvátu najprv na oxalacetát. Premeny sa zúčastňujú dva enzýmy: Pyruvátkarboxyláza katalyzuje za využitia ATP vznik oxalacetátu z pyruvátu a HCO_3^- . P-Pyr-karboxykináza (PEPCK) prevádza oxalacetát na P-Pyr za využitia GTP ako fosforylačného činidla. Acetyl-CoA reguluje pyruvátkarboxylázu. Syntéza oxalacetátu je dopĺňujúcou reakciou, zvyšujúcou aktivitu citrátového cyklu. Hromadenie acetyl-CoA signalizuje zvýšenú potrebu oxalacetátu. P-Pyr-karboxykináza katalyzuje dekarboxyláciu oxalacetátu za účasti GTP, pričom vzniká P-Pyr a GDP. Glukoneogenéza vyžaduje transport metabolitov medzi mitochondriami a cytosolom.

2. Glyoxylátová dráha

Rastliny majú na rozdiel od živočíchov enzýmy, ktoré prevádzajú acetyl-CoA na oxalacetát glyoxylátovou dráhou. Tieto enzýmy sú prítomné v mitochondriách a glyoxyzómoch. V glyoxylátovej dráhe dochádza k čistej konverzii acetyl-CoA na glyoxylát, zatiaľ čo

v cytrátovom cykle je acetyl-CoA premenený na dve molekuly CO₂. V tejto dráhe vznikajú oxalacetát z dvoch molekúl acetyl-CoA.



3. Biosyntéza oligosacharidov a glykoproteínov

Syntéza laktózy: Niekoľko syntetizovaných disacharidov slúži ako metabolické palivo. Typickým predstaviteľom je laktóza [O-β-D-galaktosyl-(1→4)-α-D-glukóza, mliečny cukor], ktorá je syntetizovaná v mliečnej žľaze laktosynthasou. Donorom tejto reakcie je UDP-galaktóza, akceptorom je glukóza.

Syntéza glykoproteínov: glykoproteíny s N-glykozidovými väzbami vznikajú v endoplazmatickom retikule a sú ďalej upravované v Golgiho aparáte. Syntéza ich sacharidových zložiek prebieha v štyroch krokoch: syntéza lipidového prekursoru oligosacharidov, prenos tohto prekursoru na NH₂-skupinu asparagínového zvyšku rastúceho polypeptidu, odstránenie niektorých sacharidových jednotiek prekursoru, väzba sacharidových zvyškov na zvyšné jadro oligosacharidu. O-Glykozidové viazané oligosacharidy vznikajú posttranslačne. Vznikajú v Golgiho aparáte postupnou väzbou monosacharidových jednotiek na hotový polypeptidový reťazec. Syntéza začína prenosom N-acetylgalaktosamínu (GalNAc) z UDP-GalNAc na zvyšok serínu alebo threonínu v polypeptide prostredníctvom GalNAc-transferázy. Lokalizácia glykosylačných miest je určená iba sekundárnou štruktúrou polypeptidu. Glykosylácia pokračuje postupnou väzbou galaktózy, sialových kyselín, N-acetylglukosamínu a fukózy odpovedajúcimi glykozytransferázami.

4. Pentózový cyklus

Kým sa NADH zúčastňuje využitia voľnej energie oxidácie metabolitov pre syntézu ATP, NADPH sa zúčastňuje využitia voľnej energie oxidácie metabolitov pre iné endergonické reakcie biosyntézy. Bunky za normálnych podmienok udržiavajú pomer [NAD⁺] / [NADH] na hodnote blízkej 1000, čo zvyhodňuje oxidáciu metabolitov, zatiaľ čo udržiavanie pomeru [NADP⁺] / [NADPH] okolo hodnoty 0,01 uprednostňuje reakciu metabolitov (VOET, VOETOVÁ, 1990).

2.2.3 Metabolizmus lipidov

Lipidy hrajú nezastupiteľnú rolu v štruktúre a metabolizme buniek. Napríklad cholesterol je životne dôležitou zložkou bunecných membrán a prekursorom steroidných hormónov a žlčových kyselín. Jeho biosyntéza, transport a využitie sú prísne regulované. Glykolipidy a fosfolipidy sú hlavnými zložkami biomembrán.

Pred vlastnou oxidáciou sú mastné kyseliny prevádzané acyl-CoA-syntházou na svoje acylkoenzýmy A v procese využívajúcom ATP. β -oxidácia mastných acyl-CoA prebieha po jednotkách C_2 , aby sa mohli mastné acyl-CoA o párnom počte C úplne premeniť na acetyl-CoA. Úplná oxidácia acetyl-CoA, NADH a $FADH_2$ je dosiahnutá citrátovým cyklom a oxidačnou fosforyláciou. Oxidácia nenasýtených mastných kyselín a mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov prebieha tiež ako β -oxidácia, ale vyžaduje účasť ďalších enzýmov.

Biosyntéza mastných kyselín sa od ich oxidácie líši v niekoľkých ohľadoch. Zatiaľ čo oxidácia mastných kyselín prebieha v mitochondriách a využíva estery acyl-CoA, biosyntéza mastných kyselín prebieha v cytosole, pričom rastúci acylový zvyšok je pripojený esterovou väzbou k proteínu prenášajúcemu acylové skupiny (ACP). Redoxné koenzýmy sa líšia (FAD a NAD^+ pre oxidáciu, NADPH pre biosyntézu) podľa stereochemie jednotlivých krokov dráhy. Výsledkom oxidácie je acetyl Co-A, zatiaľ čo intermediárnym prekursorom v biosyntéze je malonyl-CoA. Acetyl-CoA je prenášaný z mitochondrie do cytosolu ako citrát transportným systémom pre trikarboxylát, nasleduje štiepenie citrátu, ktoré tiež generuje časť NADPH potrebného pre biosyntézu. Metabolizmus mastných kyselín je regulovaný allosterickou kontrolou hormonálne citlivej triacylglycerollipázy a acetyl-CoA-karboxylázy, fosforylácií a defosforylácií, prípadne tiež zmenami rýchlosti syntézy a odbúraním proteínov. Táto regulácia je sprostredkovaná hormónmi glukagénom, adrenalínom a noradrenalínom, ktoré aktivujú odbúranie, a inzulínom, ktorý aktivuje biosyntézu. Tieto hormóny spolupracujú pri regulácii koncentrácie cAMP, ktorá naopak kontroluje pomery fosforylácie/defosforylácie (SMIRNOFF, 1995; VOET, VOETOVÁ, 1990).

2.2.4 Metabolizmus aminokyselín

Aminokyseliny sú prekursori mnohých látok obsahujúcich dusík, ako je hem, fyziologicky aktívne aminy a glutathion. Prvým krokom pri degradácii aminokyselín je odstránenie α -aminoskupiny v transaminačnej reakcii. Aminokyseliny sú prenášané na 2-oxoglutarát, pričom vzniká glutamát, na oxalacetát za vzniku aspartátu alebo na pyruvát pri tvorbe alanínu. Glutamát je následne oxidačne deaminovaný, uvoľňuje sa NH_3 a obnovuje sa 2-oxoglutarát. V močovinovom cykle sa aminokyseliny z amoniaku a asparátu zlučujú s HCO_3^- na močovinu. Na začiatku je reakcia katalyzovaná karbamoylfosfátsynthetázou, pri nej za spotreby ATP kondenzuje NH_4^+ a HCO_3^- . Výsledný karbamoylfosfát reaguje s ornitínom a vzniká citrulín, ktorý spolu s aspartátom tvorí argininosukcinát, a ten je rozložený na fumarát a arginín. Arginín je hydrolyzovaný na ornitín vracajúci sa späť do cyklu a na močovinu, ktorá je z organizmu vylučovaná. Močovinový cyklus je regulovaný N-acetylglutamátom, ktorý pôsobí ako allosterický aktivátor karbamoylfosfátsynthetazy. Transamináciou vzniknutej α -oxokyseliny sú degradované na medziprodukty citrátového cyklu alebo ich prekursori. Leucín a lyzín sa nazývajú ketogénne aminokyseliny, pretože sú premenované na ketonové látky, ktoré sú prekursori acetyl-CoA a acetoacetátu. Zostávajúce aminokyseliny sú všetky aspoň čiastočne glukogénne, pretože pri ich premene vznikajú prekursori glukózy, ako sú pyruvát, oxalacetát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA a fumarát. Alanín, cysteín, glycín, serín a treonín sú premenované na pyruvát.

Serín-hydroxymethyltransferáza katalyzuje za pomoci PLP rozštiepenie väzby $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ serínu, čím vzniká glycín. Reakcia vyžaduje prítomnosť tetrahydrofolátu (THF), ktorý sa stáva akceptorom jednotky C_1 . Asparagín a asparát sú premenované na oxalacetát. 2-oxoglutarát vzniká pri degradácii arginínu, glutamátu, glutamínu, histidínu a prolínu. Metionín, izoleucín a valín sú degradované na sukcinyl-CoA. Premena rozvetvených aminokyselín sa podobá oxidácii všetkých acyl-CoA. Tryptofán sa rozkladá na alanín a acetyl-CoA. Fenylyalanín a tyrozín sú degradované na fumarát a acetoacetát. Hem je syntetizovaný z glycínu a sukcinyl-CoA. Z aminokyselín sú tiež syntetizované hormóny a nervové mediátory, ako napr. L-DOPA, adrenalín, noradrenalín, serotonín a histamín. Glutathion, ktorý je tripeptidom z glutamátu, cysteínu a glycínu, je súčasťou mnohých ochranných, transportných a metabolických procesov.

Základným zdrojom dusíka pre výstavbu aminokyselín je atmosferický N_2 . Tento interný plyn však musí byť najprv redukovaný na metabolicky využiteľnú formu NH_3 v procese nazývanom fixácia a asimilácia dusíka (SMIRNOFF, 1995; VOET, VOETOVÁ, 1990).

2.2.5 Metabolizmus nukleotidov

Nukleové kyseliny sú lineárne polyméry nukleotidov obsahujúcich buď ribózové zvyšky v RNA, alebo deoxyribózové zvyšky v DNA. RNA na rozdiel od DNA podlieha bázicky katalyzovanej hydrolýze. Nukleové kyseliny je možné deliť viacerými metódami používanými k deleniu proteínov. Jednovláknová DNA sa oddelí od dvojvláknovej chromatografijov na hydroxyapatitu. Elektroforéza v polyakrylamidovom alebo agarosovom géle rozdelí DNA hlavne podľa veľkosti. Obzvlášť veľké DNA môžu byť rozdelené pulznou elektroforézou na agarosovom géle. Nukleové kyseliny môžu byť sekvenované použitím rovnakej stratégie, ako sa používa pri sekvencii proteínov. Definované fragmenty DNA sa získavajú pomocou reštrikčnej endonukleázy typu II, štiepiacej DNA v špecifických, obvykle palindromových sekvenciách 4-6 báz. Oligonukleotidy sú nepostrádateľné v technológii rekombinantnej DNA. Využívajú sa k identifikácii normálnych a mutovaných génov a k špecifickému pozmeňovaniu génov bodovo cielenou mutagenézou.

Fragment DNA môže byť produkovaný vo veľkom množstve, ak je metódami rekombinantných DNA vnesený do vhodného klonovacieho vektoru. Tým môžu byť geneticky upravené plazmidy, bakteriofágy, kozmidy alebo umelé kvasničné chromozómy. Metódy génového inžinierstva umožňujú produkciu veľkého množstva vzácnych alebo špecificky pozmenených proteínov.

Takmer všetky bunky syntetizujú purínové nukleotidy *de novo* podobnými metabolickými dráhami. Purínový kruh vzniká jedenástimi reakčnými krokmi, kedy konečným produktom je IMP. Ďalšie purínové nukleotidy, AMP a GMP, sú syntetizované z IMP v samostatných dráhach. Nukleoziddifosfáty a trifosfáty sú z týchto produktov postupne tvorené fosforyláciou. Purínové nukleotidy môžu byť tiež syntetizované z voľných purínov, uvoľnených pri degradácii nukleových kyselín.

Pyrimidíny sú v bunkách rovnako syntetizované *de novo*, ale v šesťstupňovej dráhe sa najskôr tvoria voľné bázy, ktoré sú až potom premenené na nukleotid, UMP. UTP vzniká fosforyláciou UMP. Syntéza pyrimidínov je regulovaná spätnoväzobnou inhibíciou, práve tak ako u purínových nukleotidov.

Deoxyribonukleotidy vznikajú redukciou príslušných ribonukleotidov. Sú známe tri typy ribonukleotidreduktaz. Prvá sa vyskytuje takmer u všetkých eukaryot a mnohých prokaryot, v aktívnom mieste obsahuje skupinu $\text{Fe}^{3+} - \text{O} - \text{Fe}^{3+}$ a voľný tyrosylový radikál. Zvyšné typy (vyskytujúce sa len u prokaryot) obsahujú ako kofaktor buď vitamín B₁₂, alebo Mn (SMIRNOFF, 1995; VOET, VOETOVÁ, 1990).

2.2.6 Metabolizmus, biologické vlastnosti a význam primárnych a sekundárnych zlúčenín v rastlinách

Sekundárny metabolizmus je svojimi procesmi úzko spojený s primárnym metabolizmom, pričom jeho vedľajšie a konečné produkty (sekundárne metabolity) nemajú v metabolizme rastlín tak zásadný význam a obvykle nie sú životne nepostrádateľné. Často však ide o zaujímavé a užitočné rastlinné produkty, zvlášť v medicíne. Sekundárne metabolity pochádzajú prevažne z metabolizmu cukrov a aminokyselín a v rastlinách sa väčšinou vyskytujú v menších množstvách (WINK, 1999; SMIRNOFF, 1995).

Množstvo z nich sa považuje za produkty detoxikačných procesov, ktorými sa rastlina zbavuje reaktívnych odpadov metabolizmu, funkcia mnohých je nejasná. Rastliny, na rozdiel od živočíchov, majú veľmi obmedzené možnosti vylučovania nepotrebných produktov metabolizmu, preto v nich sekundárne metabolity väčšinou zostávajú a skladujú sa v niektorých častiach buniek. Rastliny tak obsahujú množstvo špecifických zlúčenín, často navzájom veľmi odlišných a veľmi pestrého zloženia. Tieto látky bývajú príznačné pre určitý druh, môžu sa vyskytnúť u viacerých druhov, niekedy tiež u celého rodu, prípadne čeľadi (NOVÁK, 2007).

Rastliny produkujú v prírode sekundárne metabolity ako obranný mechanizmus na atak rôznymi patogénmi, alebo ako odpoveď na stres. Zistilo sa, že ako celistvé rastliny, tak aj rastlinné bunky sú schopné reagovať rovnakým spôsobom aj v prípade, že nie sú napadnuté patogénom, ale sú len vystavené účinku určitých zlúčením pochádzajúcich z patogéna. Tieto zlúčeniny sú známe ako elicitory a sú signálom pre tvorbu sekundárnych metabolitov. Elicitory môžu byť biotické (pochádzajúce z patogénov) alebo abiotické (ťažké kovy, sucho a pod.) a používajú sa na stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov a skrátenie času na dosiahnutie maximálnej koncentrácie želaného produktu (MISAWA, 1994; DONG a ZHONG, 2001).

Mnohé z týchto zlúčenín majú výrazné účinky na ľudský organizmus. Účinné látky obsiahnuté v rastlinách vznikajú predovšetkým ako produkty sekundárneho metabolizmu, majú určité chemické zloženie a u rôznych druhov bývajú často veľmi odlišné. Môžu sa vyskytnúť v ktorejkoľvek časti rastliny. Alkaloidy patria k najpočetnejšej skupine látok druhotného pôvodu v rastlinách, pre človeka a zvieratá sú často veľmi jedovaté. Spravidla ide o dusíkaté zlúčeniny alkalického povahy tvoriace väčšinou soli s organickými kyselinami (šťavelovou, mliečnou, jablčnou, citrónovou, vinnou a iné). V rastline sa spravidla vyskytuje viac alkaloidov, pričom ich obsah u jednotlivých rastlín toho istého druhu často kolíše.

Väčšina alkaloidových rastlín je už dávno známa svojou toxicitou, halucinogénnymi účinkami, využitím v ľudovej medicíne i pre priemyselnú výrobu liečiv (NOVÁK, 2007).

Niektoré sekundárne metabolity, ako sú glukozinoláty a niektoré saponíny, sa ukladajú v rastlinách ako inaktívne prekurzory. Rastlina ich môže premeniť na biologicky aktívne látky pri útoku fytopatogénov. Tieto zlúčeniny sa označujú termínom “predtvarované“ (VAN ETTEN a kol, 1994).

Niektoré fungicídne zlúčeniny môžu byť prítomné len v jednej časti rastliny, ale sú aj také, ktoré sú prítomné vo viacerých častiach rastliny (VAN ETTEN a kol., 1994; OSBOURN, 1999).

Mnohé zlúčeniny majú dokázaný fungicídny účinok *in vitro* a preto sa používajú ako prirodzená fytoochrana rastlín (GRAYER a HARBORNE, 1994; OSBOURN, 1996, 1999; VAN ETTEN, 1995).

2.2.6.1 Alkaloidy

Alkaloidy sú dusíkaté látky rastlinného pôvodu (produkty z rozkladania bielkovín v rastlinných organizmoch). Dusík je spravidla viazaný v kruhu, takže ich možno zaradiť medzi deriváty heterocyklických zlúčenín. Majú zložitú štruktúru a viaceré z nich možno považovať za deriváty aminokyselín. Z chemického hľadiska sa vyznačujú zásaditosťou (prítomnosť dusíka v molekule). Reagujú s niektorými karboxylovými kyselinami (kyselina jablčná, citrónová, oxálová, jantárová a pod.). Vytvárajú soli, ktoré sú vo vode dobre rozpustné. Vďaka silnému fyziologickému účinku na vyššie živočchy sa v medicínskej praxi alkaloidy používajú vo forme drog a preparátov z nich alebo aj čisté vo forme soli. V súčasnosti je dokázané, že prírodnú kombináciu alkaloidov s ich pridružujúcimi rastlinnými látkami prijíma ľudský organizmus lepšie a ich pôsobenie je fyziologickejšie a účinnejšie. Pridružujúce látky sú bielkoviny, saponíny, enzýmy, farbivá a iné, ktoré spoločne pôsobia na absorpciu.

Rozdelenie alkaloidov podľa základného heterocyklu:

1. alkaloidy s cyklom pyridínunikotín, konín, piperín
 2. alkaloidy s cyklom tropánuatropín, kokaín
 3. alkaloidy s cyklom chinolínu alebo izochinolínu-narkotické látky (opiáty) = morfín, heroín, kodeín chinín, papaverín
 4. alkaloidy s cyklom indolu-halucinogény = dietylamid kyseliny lysergovej (LSD), lysergid; DMT
 5. alkaloidy s cyklom purínukofeín, teobromín, teofilín Nikotín
- (http://referaty.atlas.sk/prirodne_vedy/chemia/21439/?page=0).

2.2.6.2 Terpenoidy

V prírode sa vyskytuje veľký počet terpénov. Môžu byť alifatické i cyklické. V organizme môžu mať rozličnú funkciu. Terpény s 10 atómami uhlíka v molekule sú monoterpény. Polyterpény sa skladajú z väčšieho počtu monomérových jednotiek. Monoterpény sa vyskytujú najmä v rastlinách, ale možno ich nájsť aj v baktériách i v živočíchoch. Predstaviteľom alifatických terpénov môže byť myrcén. Oveľa dôležitejšie sú kyslíkové deriváty alifatických terpénov. Prítomnosť kyslíka najčastejšie v alkoholovej, ale i aldehydovej, ketónovej, esterovej, éterovej, laktónovej a fenolovej skupine, i poloha dvojitej väzby vplývajú na charakter vône týchto látok. Podobne aj prítomnosťou dusíka alebo síry získavajú osobitne výraznú vôňu. Linalol sa vyskytuje v kvetoch konvalinky, v pomarančovom a v koriandrovom éterickom oleji. Je zložkou broskyňovej vône. Geraniol je v eukalyptovom a v ružovom oleji, kde sa vyskytuje spolu s citranelom.

Z monocyklických terpénov je najdôležitejší limonén. Tvorí hlavnú zložku citrusových éterických olejov. Kôra citrusových plodov obsahuje 90 % z celkového množstva limonénu, preto má výraznú vôňu. Štruktúrne skoro totožný s limonénom je karvón. Odlišuje sa len polohou jednej dvojitej väzby a práve táto zmena výrazne vplýva na voňavý charakter látky. Karvón má vôňu ako rasca. Nachádza sa v rasci, kôpri a v terpentínovom oleji. Medzi rastlinné monoterpény patria aj glykozidy i rastlinné hormóny – kyselina abscisová, gyberelíny. V niektorých rastlinách sa zistil juvebión a niektoré iné látky. V rastlinách sa vyskytujú aj polyterpény, zložky viacerých živíc. Kaučuk a gutaperca sú polyméry blízke izoprénu. Polyizoprénový reťazec kaučuku sa skladá z 500 – 5000 izoprénových jednotiek, no reťazec gutaperča len asi zo 100 jednotiek. Kaučuk produkuje predovšetkým kaučukovník *Hevea brasiliensis*, gutaperču strom *Palaguium gutta*.

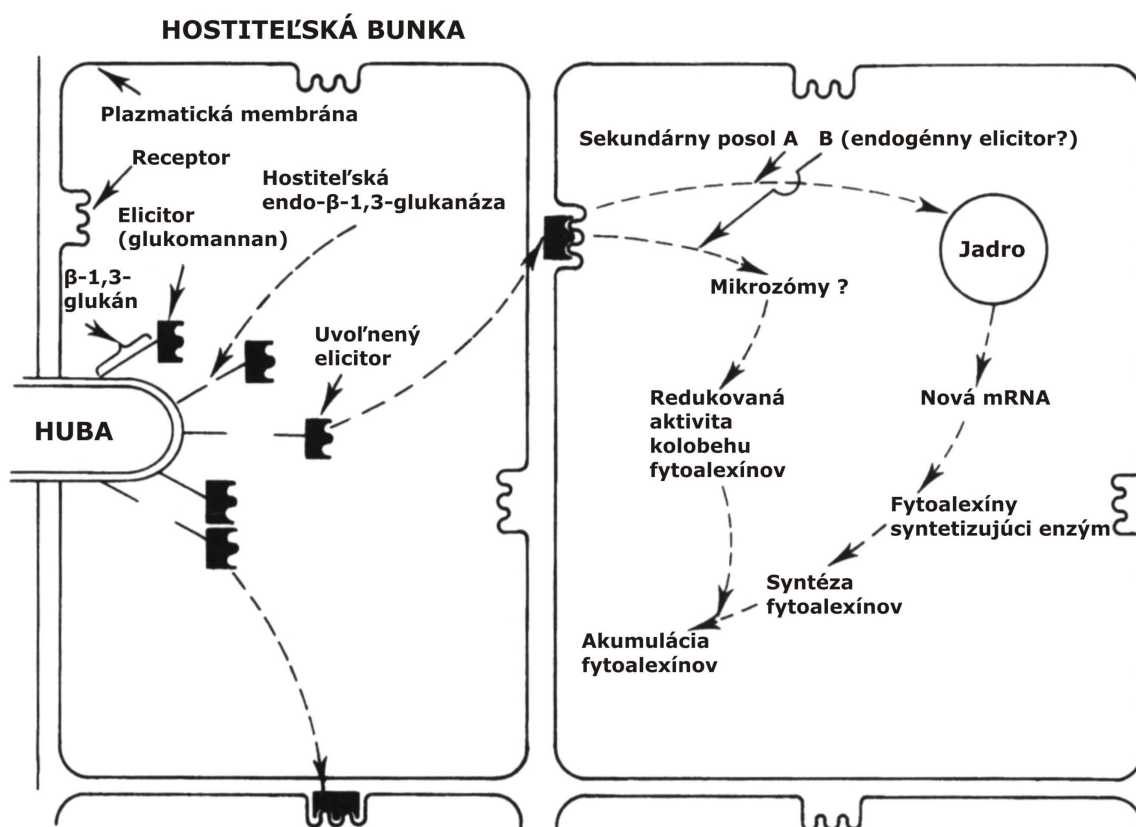
2.2.6.3 Flavonoidy

Flavonoidy sú fenolové látky, ktoré sú v rastlinnej ríši veľmi rozšírené a chránia rastliny pred škodlivými činiteľmi. Zahŕňajú skoro 4000 známych derivátov. Podobne ako karotenoidy aj flavonoidy sa vyznačujú priaznivým účinkom na organizmus a spolupôsobia s vitamínom C. Oproti iným antioxidantom majú tú výhodu, že sú aktívne vo vodnom aj v lipofilnom prostredí, a preto patria v mnohých smeroch k najmenej tak účinným antioxidantom ako vitamín C a vitamín E. Flavonoidy chránia pred aterosklerózou a potláčajú aj tvorbu nebezpečných aldehydov, čo ich spája s ochranou pred nádorovou aktivitou. Medzi najvýznamnejšie flavonoidy patria látky: kamferol, kvercetín, hesperidín, rutín,

antokyanidíny, katechín, fenyylpropanoidy a iné. Vo všeobecnosti sa vyskytujú všade tam, kde je viazaný vitamín C. K významným zdrojom patria: zelený čaj, červené víno, citrusové plody, brokolica, cibuľa, v šupka jablák, čučoriedky, čierne ríbezle, šípky, zeler, petržlen, grapefruit, najmä červený, bobuľové ovocie, obilie, rajčiaky (ŠKÁRA, FERENČÍK, 1983).

2.2.6.4 Fytoalexíny

Fytoalexíny sú obranné látky s antimikrobiálnymi vlastnosťami, ktoré produkujú rastliny po napadnutí mikroorganizmami, najmä fytopatogénnymi hubami a vírusmi. Fytoalexíny sú hlavnými predstaviteľmi skupiny látok, ktoré v rastlinách plnia funkciu imunitného systému. Majú nielen antimikrobiálny účinok, ale pôsobia aj tak, že pomáhajú izolovať časť napadnutú fytopatogénnymi mikroorganizmami od ostatného tela rastliny. Napríklad list napadnutý hubami po určitom čase odumrie, vyschne a odpadne (obranná nekróza) (SMITH,1996).



Obr. č.3 Schéma signalizácie stresu v rastlinnej bunke v stresovej odpovedi rastlín na biotický stres (napadnutie rastliny patogénnou hubou) (http://is.muni.cz/th/150559/prif_b/EVrechnikova.pdf)

2.2.6.5 Fenoly

Fenoly sú aromatické alkoholy, ktoré obsahujú -OH skupinu naviazanú na aromatickom jadre. Fenoly a ich deriváty sú široko rozšírené prírodné látky, ktoré sú produkované celou radou rastlín a živočíchov, ale i človekom. Prírodné sa vyskytujú v mnohých druhoch potravín a tiež v prídavných látkach, ktoré dávajú potravinám farbu, chuť a vôňu. Do skupiny fenolov patria látky prirodzene sa vyskytujúce, ale i človekom vyrobené zlúčeniny. Hoci obsahujú -OH skupinu rovnako ako alkoholy, majú podstatne odlišné vlastnosti. Sú to bezfarebné kvapaliny, kryštalické látky charakteristického zápachu. Na vzduchu sa oxidujú a sfarbia sa dohneda. Dobro sa rozpúšťajú v organických zlúčeninách, vo vode málo alebo vôbec. Všetky sú zdraviu škodlivé. Väčšina je karcinogénna (rakovintvorná). Môžu tvoriť vodíkové mostíky, preto majú vyšší bod varu alebo môžu byť rozpustné vo vode. Fenoly sú silnejšie kyseliny ako alkoholy, pretože ľahko odštepujú protón (kation vodíkový). Kyslosť sa zvyšuje pridaním skupín s +M a -I efektom (napr. -NO₂). Získavajú sa destiláciou čierneho dechtu. Majú dezinfekčné účinky. Sú jedovaté a leptavé (<http://referaty.atlas.sk/prirodne-vedy/chemia/50908/fenoly-a-ich-vplyv-na-zivotne-prostredie-a-cloveka>)

2.2.6.6 Glykozidy

Saponíny sú rastlinné steroidné glykozidy, ktoré majú detergentné vlastnosti. Niektoré z nich sú toxické a používajú sa v medicíne. Digitonín sa vyskytuje v náprstníku. Jeho sacharid má špecifický účinok na srdcový sval. Je veľmi jedovatý. Ubaín je špecifický inhibítor sodíkovej pumpy.

2.2.6.7 Steroidy

V ríši rastlín sa vyskytujú viaceré alkaloidy na báze steroidov. V pokožke a v kľúčkoch zemiakov je jedovatý solanidín. Ekdyzón je steroidný hormón hmyzu. Viaceré rastliny produkujú látky s podobným účinkom. V nadbytku je toxický. Tieto látky sa v rastlinách tvoria najmä preto, aby ich ochránili pred škodcami (ŠKÁRA, FERENČÍK, 1983).

Maceráty a extrakty z mnohých rastlín obsahujú zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré zabraňujú rastu húb *in vitro*. Tieto látky sa nachádzajú buď v zdravých, nenapadnutých rastlinách alebo sa nachádzajú v rastlinách ktoré už boli napadnuté (OSBOURN, 1999; VAN ETTEN, 1994; KUČ, 1995).

Obsahujú zoskupenie sekundárnych metabolitov, ako sú fenoly, saponíny, kyanogénne glykozidy, cyklická hydroxámová kyselina, izoflavonoidy, deriváty indolu obsahujúce síru a mnohé iné. Izoflavonoidy, terpenoidy a polyacetylenové fytoalexíny inhibujú rast mnohých patogénnych a nepatogénnych húb. Okrem fungicídneho účinku pôsobia inhibične aj na rast niektorých baktérií. Mnohé antimikrobiálne zlúčeniny sú vo vnútri rastlinných buniek lokalizované buď v ich biologicky aktívnej forme alebo ako inaktívne prekurzory, ktoré sa aktivujú po napadnutí patogénom (OSBOURN, 1996).

Kombinácia rozličných zlúčenín môže mať synergický efekt. Napríklad na patogén rajčiny môže pôsobiť nielen na steroidný glykoalkaloid α -tomatín, ale aj na fytoalexín rišitín (SULEMAN a kol., 1996).

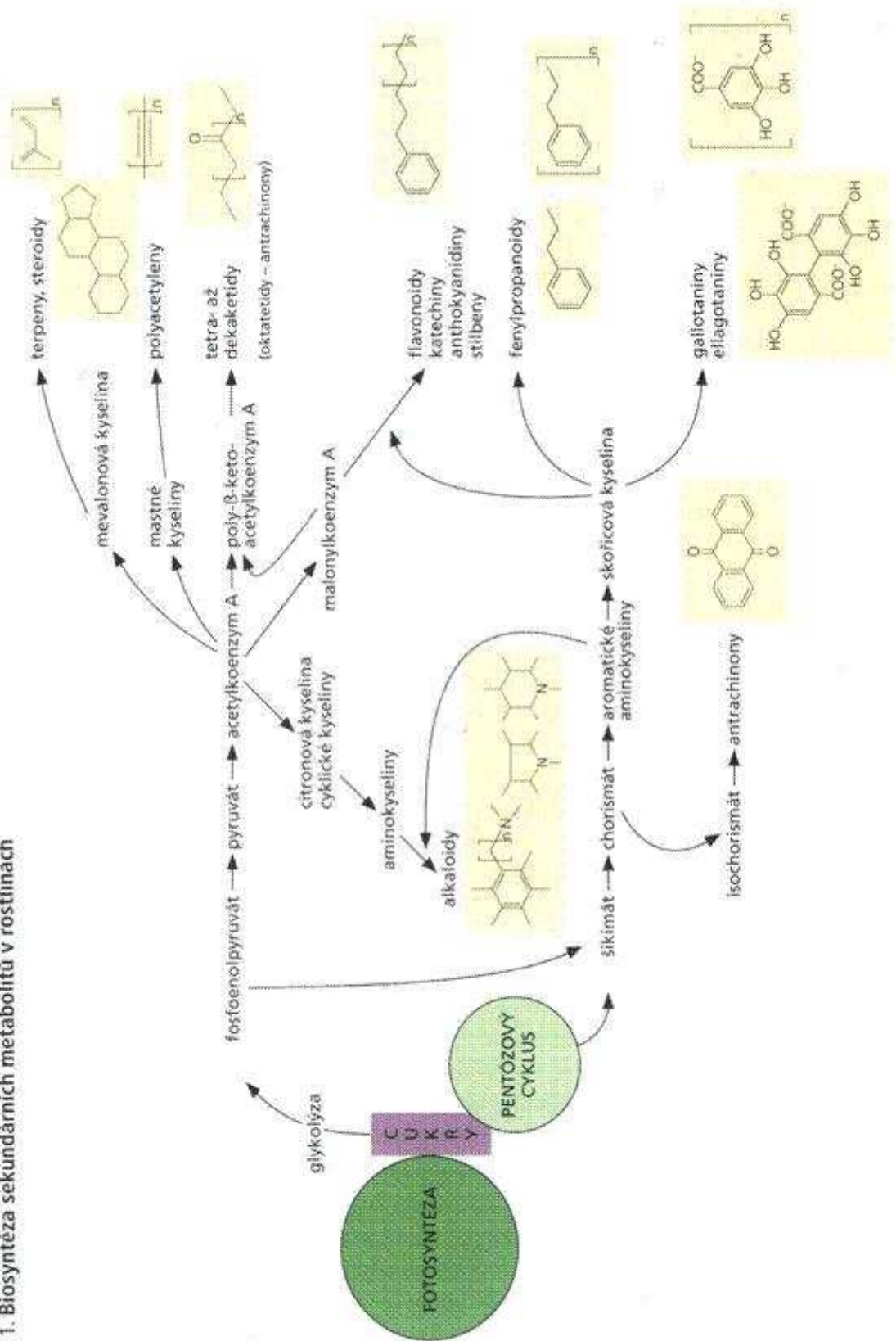
2.2.7 Cesty biosyntézy sekundárných metabolitov v rastlinách a faktory ovplyvňujúce ich produkciu

Sekundárny metabolizmus nadväzuje na primárny metabolizmus, v ňom najmä na metabolizmus uhlíka a v menšej miere na metabolizmus dusíka. Väčšina heterotrofných mikroorganizmov využíva glukózu ako základný zdroj uhlíka a energie. Niekoľko fungálnych metabolitov je odvodených priamo od glukózy, ale uhlík glukózy sa stáva použiteľný aj pre mnohé biosyntetické procesy pri tvorbe intermediátov v rade energií uvoľňujúcich reakcií. Ak sa intermediáty nepoužijú na syntetické účely, celkový výsledok reakčného poradia je oxidácia molekuly glukózy na CO_2 a vodu s produkciou 38 molekúl ATP. Disimilácia glukózy začína jej premenou na triózy Embdenovou-Meyerhofovou dráhou alebo pentózofosfátovým cyklom.

Ďalšia dráha vytvára pentózy, dôležité v biosyntéze nukleotidov a tetrózy, ktorá môže reagovať s fosfoenolpyruvátom a poskytuje kyselinu šikimovú. Kyselina šikimová je intermediátom pre aromatické aminokyseliny a tiež pre mnohé sekundárne metabolity. Trióza je tiež prekursor serínu, ktorý sa premieňa na glycin so stratou atómu uhlíka, a ten vstupuje do bunkovej hotovosti C1 - zlúčenín. Postupnou dráhou uhlíka sa trióza premení v prvej fáze na pyruvát a potom na acetyl-CoA, ktorý je najdôležitejším samostatným intermediátom vo fungálnom sekundárnom metabolizme. Karboxyláciou acetyl-CoA sa získava malonyl-CoA a lineárnou kondenzáciou acetyl-CoA s rôznym počtom molekúl malonyl-CoA sa získavajú polyketidy, najčastejšie sú to sekundárne metabolity húb alebo mastné kyseliny, ktoré môžu spätne viesť k vzniku sekundárných metabolitov. Aktinomycéty sú schopné tvoriť polyketidy jednak z acetyl-CoA a malonyl-CoA, ale aj z propionyl-CoA a metylmalonyl-CoA. Alternatívne, kondenzáciou troch molekúl acetyl-CoA sa získava kyselina mevalónová ako kľúčový intermediát v biosyntéze terpenoidov. Kondenzáciou acetyl-CoA s oxálacetátom uhlík pochádzajúci z glukózy vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselín a slúži nielen na úplnú oxidáciu glukózy, ale tiež ako materiál uhlíkových skeletov niektorých aminokyselín alebo sekundárných metabolitov.

Vznik koncových primárných a sekundárných metabolitov si môžeme predstaviť tak, že existujú rozvetvené metabolické dráhy a v nich príslušné medziprodukty, od ktorých jedna vetva dráhy vedie ku koncovému primárnemu metabolitu a druhá vetva ku sekundárnemu metabolitu (http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_05_406-414.pdf).

Schéma 1. Biosyntéza sekundárných metabolitů v rastlinách



Obr. č.4 Biosyntéza sekundárných metabolitov v rastlinách
http://www.plantae.sk/carnivorous/info/metabolity_drosera.htm

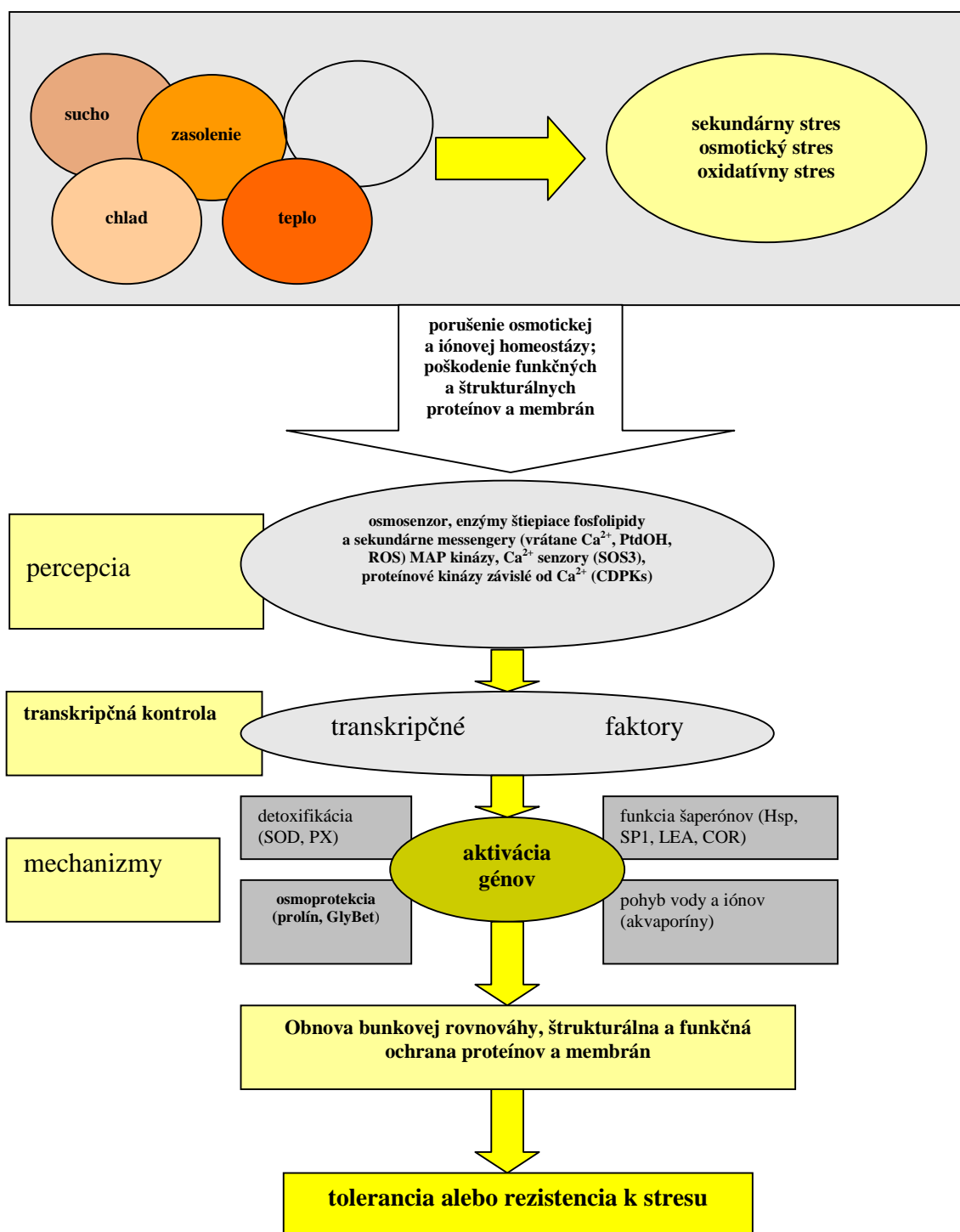
2.2.7.1 Vonkajšie faktory produkcie sekundárnych metabolitov

Rastliny produkujú v prírode sekundárne metabolity ako obranný mechanizmus na atak rôznymi patogénmi, alebo ako odpoveď na stres. Zistilo sa, že ako celistvé rastliny, tak aj rastlinné bunky sú schopné reagovať rovnakým spôsobom aj v prípade, že nie sú napadnuté patogénom, ale sú len vystavené účinku určitých zlúčením pochádzajúcich z patogéna. Tieto zlúčeniny sú známe ako elicítory a sú signálom pre tvorbu sekundárnych metabolitov. Elicítory môžu byť biotické (pochádzajúce z patogénov) alebo abiotické (ťažké kovy, sucho a pod.) a používajú sa na stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov a skrátenie času na dosiahnutie maximálnej koncentrácie želaného produktu (MISAWA, 1994; DONG a ZHONG, 2001).

V prípade, ak stres pôsobí na nepripravenú rastlinu rýchlo, bezprostredne s prerušením rastu, t.j. bez zapojenia reakcií na úrovni organizmu, vtedy poškodenie závisí od stability všetkých štruktúr - od molekulárnych, subbunkových do anatomicko-morfologických. V prípade, ak stres pôsobí na nepripravenú rastlinu rýchlo, bezprostredne s prerušením rastu, poškodenie závisí od stability všetkých štruktúr. V prírode sa však častejšie vyskytuje stres postupný - gradujúci, dlho pôsobiaci s nie vysokou silou, v dennom cykle sa často striedajúci s pomerne priaznivými obdobiami pre rast, tak vtedy má základný význam stabilita (odolnosť) funkcií a adaptačné procesy realizujúce sa najmä cestou rastu rastliny. Stres možno charakterizovať ako závislú premennú reakciu organizmu na ľubovoľné pôsobenie okolitého prostredia. Pod stresom možno rozumieť všeobecnú adaptačnú reakciu organizmu na vznikajúce narušenie homeostázy, všeobecnú nešpecifickú hormonálnu reakciu biologického systému v podmienkach ohrozujúcich narušenie homeostázy. Je zrejmé, že tento funkčný stav vzniká v dôsledku negatívneho pôsobenia faktorov na jeho funkcie a procesy (LICHTENTHALER et al., 1996).

Stres sa vo fyziológii a ekofyziológii rastlín vždy spája s pôsobením nepriaznivých faktorov prostredia, pričom sa diskutuje o strese z hľadiska druhu limitujúceho faktora, dĺžky a intenzity pôsobenia, percepcie a transdukcie signálu, mechanizmu vzniku stresu a jeho dopadu na procesy a funkcie organizmu. Stres je komplex nešpecifických biochemických a fyziologických reakcií organizmu alebo odpoveď na pôsobenie extrémneho podráždenia rôznej povahy (nadbytok alebo nedostatok faktorov prostredia, zmeny vzájomného pôsobenia medzi subjektom a jeho prostredím, atď.). Biologický zmysel stresovej reakcie je v mobilizácii tých štruktúr funkčných systémov, ktoré zabezpečujú realizáciu a formovanie

efektívnej odpovede a voľby optimálneho variantu integrálnej reakcie (HALL, 2001; JENKS, HASEGAWA, 2005; BRESTIČ, OLŠOVSKÁ, 2001).



Obr. č.5 Schéma účinku abiotických stresov v rastlinách na génovej, molekulárnej až metabolickej úrovni a ich vzťah k funkčnej integrite rastlinného organizmu (<http://images.google.sk/imgres?imgurl=http://kekule.science.upjs.sk/ekologia>)

Sekundárne metabolity a z nich najmä alkaloidy sú v rastlinách zvyčajne viazané na organické kyseliny, ako na kyselinu šťaveľovú, jablčnú, citrónovú, vínnu, mekónovú, chinovú a iné. Zriedkavejšie sa vyskytujú voľne. Obsah alkaloidov v rastline kolíše. Závisí od vegetačného obdobia, kvality a pH pôdy, vlhkosti, obsahu dusíkatých látok a iných podmienok. Rastlina pestovaná v rozličných častiach sveta nemusí obsahovať rovnaké množstvo alkaloidov (PASTÝRIK, 1979).

Expresiu metabolických dráh mnohých sekundárnych metabolitov je možné ľahko zmeniť pomocou vonkajších faktorov ako sú napr. množstvo živín, stresové faktory, svetlo a rastové regulátory. Veľa základných zložiek živných médií pre rastlinné bunkové kultúry je dôležitým ukazovateľom rastu a akumulácie sekundárnych metabolitov (MISAWA, 1994).

Okrem chemických faktorov majú na odpoveď rastlinných buniek v *in vitro* kultúre veľký vplyv aj fyzikálne vlastnosti kultivačného prostredia, napr. intenzita osvetlenia, teplota, pH živného média a koncentrácia kyslíka v tekutých živných médiách.

Osvetlenie: vplýva najmä na akumuláciu farebných sekundárnych metabolitov, akými sú antokyány a pigmenty (SEITZ, HINDERER, 1988), ale môže ovplyvniť aj zloženie iných zlúčenín v kalusových kultúrach, napr. seskviterpénov v *in vitro* kultúre *Marticaria chamomilla* (MULDER, KRIEGER a kol., 1988).

Teplota: štandardná teplota používaná na indukciu kalusového pletiva a rastu kultivovaných buniek v *in vitro* je v rozmedzí 17-25°C, ale každému rastlinnému druhu môže vyhovovať iná teplota (PIERIK, 1997).

Primerané pH: obyčajne sa upravuje v rozmedzí 5-6 pred autoklávovaním (KOVÁČ, 1995; PIERIK, 1997).

2.2.7.2 Vnútorne faktory produkcie sekundárnych metabolitov rastlín

Na zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov môže vplývať množstvo sacharidov. Rastlinné bunkové kultúry obyčajne rastú heterotrófne, pričom ako zdroj uhlíka využívajú jednoduché sacharidy. Množstvo sacharózy pôsobí na produktivitu kultúr akumulujúcich sekundárne metabolity. Zistilo sa, že osmotický stres zapríčinený samotnou sacharózou a inými osmotickými činiteľmi reguluje produkciu antokyanínov (DONG a ZHONG, 2001).

Ďalšou možnosťou zvýšenia produkcie sekundárnych metabolitov je manipulácia množstva nitrátov v živnom médiu. Zistilo sa, že koncentrácie dusíka pôsobia na množstvo proteínových a aminokyselinových produktov v bunkových suspenzných kultúrach (RAJASEKARAN a kol, 1991).

Na výťažnosť bunkových suspenzných kultúr má vplyv aj množstvo fosfátov. Udáva sa napr., že vyššie množstvá fosfátov podporujú rast buniek, pričom majú negatívny účinok na tvorbu sekundárnych metabolitov (HAGIMORI a kol., 1982).

Ďalším spôsobom zvýšenia produkcie sekundárnych metabolitov je prídavok prekurzorov do kultivačných médií. Používanie prekurzorov je populárny prístup, ktorý sa používa za účelom zvyšovania produkcie sekundárnych metabolitov. Táto koncepcia je založená na tom, že každá zlúčenina, ktorá je medziproduktom v alebo na začiatku biosyntetickej dráhy sekundárneho metabolitu sa stáva dobrým prostriedkom na zvýšenie výťažku konečného produktu (ROMAGNOLI a KNORR, 1988; YUAN a kol., 2001).

Veľký vplyv na proliferáciu buniek v *in vitro* kultúre a tým aj na výťažnosť bunkových suspenzných kultúr majú rastové regulátory. Prídavok rastového regulátora do živného média je často kľúčovým faktorom v akumulácii sekundárnych metabolitov. Typ a koncentrácia auxínov alebo cytokinínov alebo ich vzájomný pomer môže dramaticky zmeniť rastové charakteristiky kultúr a akumuláciu produktu v kultivovaných rastlinných bunkách (MISAWA, 1994; RAO a RAVISHANKAR, 2002).

Rastové regulátory sa vyskytujú prirodzene v rastlinnom organizme. Podieľajú sa na regulovaní procesov rastu a vývinu, diferenciácii, regenerácii, organogenéze a zasahujú do vzájomného pôsobenia všetkých častí a orgánov živej rastliny, ktoré sa označuje ako korelácia. Okrem natívnych rastových látok sú dnes k dispozícii aj umelé, synteticky pripravené regulátory. V oboch prípadoch ich účinok závisí od fyziologickej koncentrácie. Ich pôsobenie môže byť aj stimulačné aj inhibičné a podľa toho delíme rastové regulátory na stimulatory a inhibitory. K rastovým látkam, ktoré majú vo fyziologickom množstve stimulačný účinok patria cytokiníny, auxíny a gibberelíny (KUTINA, 1988).

Medzi rastové látky zaradujeme:

1. Cytokiníny: kinetín (KIN) bol prvý raz objavený v kvasinkách a keďže zapríčiňoval delenie buniek, bol nazvaný podľa gréckeho "kinesis" – pohyb. Po chemickej stránke je to 6-furfurylaminopurín. Onedlho potom boli nasyntetizované zlúčeniny podobných účinkov na delenie bunky a boli spoločne nazvané cytokiníny. Podporujú delenie a zväčšovanie buniek. Pôsobia aj na zakladanie a rast koreňov, nízke dávky stimulačne a vyššie dávky inhibične. Stimulujú aj zakladanie púčikov. V prírode oddaľujú nástup dormancie stromov, spomaľujú žltnutie listov a tým predlžujú ich funkciu. V pletivových kultúrach zvyšujú mitotickú aktivitu (PASTÝRIK, 1979).

Stimulujú syntézu RNA a bielkovín ako aj transport, akumuláciu a zadržiavanie metabolitov v pletivách a orgánoch, transport fosforu a auxínu. Mechanizmus účinku cytokinínov je v ich inkorporácii do určitých typov molekúl tRNA, čím ovplyvňujú transláciu (KUTINA, 1988).

6-benzylaminopurín (BAP) v porovnaní s kinetínom často vykazuje vyššiu efektivitu v rastlinných bunkových kultúrach. Je to syntetický cytokinín, ktorý sa veľmi často používa v *in vitro* kultúre na indukciu tvorby mnohonásobných výhonkov. Prídavok vyšších koncentrácií BAP do živných médií v kombinácii s vyššími koncentraciami auxínov vedie k zvýšenej tvorbe kalusového pletiva z buniek okolo rezných rán explantátov (PIERIK, 1997).

2. Auxíny: z auxínov sa najčastejšie v *in vitro* kultúre používajú kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D), kyselina α -naftyloctová (NAA) a kyselina γ -indolyloctová (IAA). 2,4-dichlórfenoxyoctová kyselina (2,4-D) je syntetický auxín veľmi často používaný v *in vitro* kultúre najmä na indukciu tzv. embryogénnych kalusov. Pre účely zakladania kalusových a bunkových suspenzných kultúr sa často používajú vyššie koncentrácie 2,4-D v kombinácii s vysokými koncentraciami cytokinínov. Stimulačný efekt 2,4-D bol v bunkovej suspenznej kultúre zistený pri biosyntéze karotenoidov v bunkách mrkvy (MOK, 1976), a pri produkcii antokyánov v kalusových kultúrach *Oxalis linearis* (MEYER a VAN STADEN, 1997). V niektorých prípadoch však bol popísaný inhibičný vplyv 2,4-D na produkcii sekundárnych metabolitov v bunkových suspenzných kultúrach (RAO a RAVISHANKAR, 2002). V takýchto prípadoch je potrebné 2,4-D nahradiť iným auxínom napr. NAA alebo IAA. Kyselina α -naftyloctová (NAA) je syntetický auxín (auxinoid) patriaci do skupiny α -arylalkylkarboxylových kyselín. Je to veľmi stabilná látka slabo rozpustná vo vode, lepšie rozpustná v teplej vode alebo v etylalkohole, či benzéne a kyseline octovej. V záhradníctve je NAA často prítomná v preparátoch, ktoré pôsobia proti normálnemu oplodneniu a u oplodnených kvetov ničia semená (KUTINA, 1988).

V *in vitro* kultúre sa NAA používa často ako prídavok do zakoreňovacích živných médií alebo v nízkej koncentrácii v kombinácii s vyššími koncentráciami BAP stimuluje adventívnu organogenezu z explantátov neobsahujúcich meristematické pletivá (PIERIK, 1997).

Pri produkcii sekundárnych metabolitov sa pridáva do živných médií tam, kde sa zisťuje inhibičný vplyv 2,4-D na produkciu sekundárnych metabolitov, napr. pri produkcii antokyánov v suspenznej kultúre *Daucus carota* (RAJENDRAN a kol., 1992), nikotínu v suspenznej kultúre *Nicotina tabacum* (SAHAI, SHULER, 1984) alebo šikonínu v suspenznej kultúre *Lithospermum erythorysum* (TABATA, FUJITA, 1985).

Kyselina γ -indolyloctová (IAA) je natívny auxín. Táto rastová látka pôvodne označená ako "heteroauxín" už v malých dávkach stimuluje predlžovanie rastových buniek a vplýva na rastové procesy rastlín. Primárnym prekurzorom biosyntézy IAA je tryptofán, medziproduktom je β -indolylacetaldehyd. Najvyššie koncentrácie IAA sú v rastových vrcholoch stoniek a koreňov, vo vrchole koleoptily, v púčikoch a v rastúcich vrcholoch listov (PASTÝRIK, 1979).

3.Giberelíny: sú rovnako ako auxíny natívne rastové látky. Po prvýkrát bol kryštalický giberelín izolovaný roku 1938. Doteraz sa chemicky identifikovalo viac ako 34 giberelínov. Označujú sa G1 – G34 a majú rôznu fyziologickú účinnosť (PIERIK, 1997).

2.3 ALKALOIDY

Alkaloidy sú dusikaté látky rastlinného pôvodu. Dusík je spravidla viazaný v kruhu, takže ich možno zaradiť medzi deriváty heterocyklických zlúčenín. Majú zložitú štruktúru a viaceré z nich možno považovať za deriváty aminokyselín.

Charakteristickým znakom alkaloidov je ich silný fyziologický účinok na vyššie živočíchy a preto sa oddávna používajú ako liečivá a omamné drogy. Pri vyšších koncentráciách pôsobia ako jedy.

V rastlinách sa často vyskytuje súčasne v niekoľko rozličných alkaloidov (napr. v kôre chinínovníka je vyše 20 rôznych alkaloidov). V rastlinách sa bežne vyskytujú v stotínach až desatinách percente, ale niektoré ich obsahujú 10 i viac percent, napr. tabak a kôra chinínovníka. Vyskytujú sa v rozličných častiach rastlín a ich množstvo sa mení počas rastu rastlín. (ONDRUŠ, 1983).

2.3.1 Využitie alkaloidov v humánnej medicíne a farmaceutizme

Pri liečbe sa využívali rôzne druhy liečivých rastlín, ktoré sú určené podľa typu drog:

- A. Kvetové drogy: Artičoka bodliakovitá (*Cynara cardunculus*), Divozel veľkokvetý (*Versascum thapsiforme*), Ďatelina lúčna (*Trifolium pratense*), Chmeľ otáčavý (*Humulus lupulus*), Ibiš lekársky (*Althaea officinalis*), Nechtík lekársky (*Calendula officinalis*), Rumanček pravý kamilkový (*Matricaria recutita*), Slniečnica ročná (*Helianthus annuus*).
- B. Vňaťové drogy: Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*), Borovica horská - kosodrevina (*Pinus mugo turra ssp. Mushus*), Čučoriedka obyčajná (*Vaccinium myrtillus*), Čakanka obyčajná (*Cichorium intybus*), Imelo biele (*Viscum album*), Jahoda obyčajná (*Fragaria vesca*), Kôpor voňavý (*Anethum graveolens*), Levanduľa lekárska (*Lavandula officinalis*), Ľuľkovec zlomocný (*Atropa bella – donna*), Majorán záhradný (*Majorana hortensis*), Dúška materina - tymián (*Thymus vulgaris*), Mäta pieporná (*Mentha piperita*), Medovka lekárska (*Melissa officinalis*), Palina dračia – obyčajná - pravá – estragón (*Artemisia dracunculus – vulgaris – assinthium*), Petržlen záhradný (*Petroselinum hortense*), Repík lekársky (*Agrimonia eupatoria*), Šalvia lekárska (*Salvia officinalis*).
- C. Listové drogy: Ibiš lekársky (*Althaea officinalis*), Jahoda obyčajná (*Fragaria vesca*), Ľuľkovec zlomocný (*Atropa bella – donna*), Mäta kučeravá (*Mentha crista*), Náprstník červený (*Digitalis purpurea*), Orech vlašský (*Juglans regia*), Repík lekársky (*Agrimonia eupatoria*), Ríbežľa čierna (*Ribes nigrum*), Skorocel kopijovitý (*Plantago lanceolata*), Zeler voňavý (*Apium graveolens*).

- D. Koreňové drogy: Archangelika lekárska (*Angelika archangelika*), Chren dedinský (*Armoracia rusticana*), Ibiš lekársky (*Althaea officinalis*), Ihlica trnistá (*Ononis spinosa*), Lopúch väčší (*Arctium lappa*), Luľkovec zlomocný (*Artropa bella – donna*), Petržlen záhradný (*Petroselinum hortense*), Zeler voňavý (*Apium graveolens*).
- E. Plodové a semenné drogy: Fazuľa obyčajná (*Phaseolus vulgaris*), Horčica biela (*Sinapis alba*), Jahoda obyčajná (*Fragaria vesca*), Kapusta (horčica) čierna (*Brassica nigra*), Kôpor voňavý (*Anethum graveolens*), Ľan siaty (*Linum usitassimum*), Mak siaty (*Papaver somniferum*), Paprika ročná (*Capsicum annum*) – koreninová, Rasca lúčna (*Carum carvi*), Ríbezľa čierna (*Ribes nigrum*), Ruža šíповá (*Rosa canina*).
- F. Kôra + drevo: Borievka obyčajná (*Juniperus communis*) – drevo, Dub letný (*Quercus robur*) – kôra, Krušina jelšová (*Frangula alnus*) – kôra, Vŕba biela (*Salix alba*) – kôra (výroba salicínu), Lieska obyčajná (*Corylus avelana*) – kôra, Pagaštan konský (*Aesculus hippocastanum*) – kôra, Pľuzgierka islendská (*Cetraria islandica*) - stielky lišajníka.
- G. Stopky listov: Luľok sladkohorský, Višňa obyčajná (*Cerasus vulgris*), Čerešňa vtáčia (*Chausus avium*).

Rozdelenie drog podľa účinku:

1. ACIDÁ (ANACIDÁ): látky zvyšujúce (znižujúce) kyslosť žalúdočných štiav,
2. ADSORBENS: viažu na povrch cudzie látky (napr. živočíšne uhlie),
3. ADSTRINGENCIÁ: zvieravé, sťahujúce prostriedky,
4. AFRODIZIAKÁ: zvyšujú pohlavnú aktivitu,
5. AMARÁ: horké látky, podporujú vylučovanie štiav, podporná funkcia pečene a žľáz, proti málokrvnosti (horčiny) - *amra pura* (čisté horčiny), *amra aromatica* (voňavé s éterickými olejmi), *amra adstringentia* (zvieravé s trieslovinami), *amra mucilaginoso* (so slizmi),
6. ANAFRODIZIAKÁ: znižujú, otupujú pohlavný pud,
7. ANALGETIKÁ: tlmia vzruchy (bolesti),
8. ANALEPTIKÁ: povzbudzujú krvný obeh, dýchanie - analeptiká centrálné (pôsobia na CNS), analeptiká periférne (pôsobia na cievy - adrenalín...), analeptiká antidepressívne,
9. ANESTETIKÁ: spôsobujú znecitlivenie - anestetiká lokálne (miestne znecitlivenie), anestetiká celkové (bezvedomie, narkóza),
10. ANTACIDÁ: zníženie kyslosti žalúdočných štiav,
11. ANTIHELMINIKÁ: proti črevným parazitom,
12. ANTIASMATIKÁ: uvoľňovanie kŕčovitých sťahov pri astme, používa sa tiež termín bronchodilatanciá,

13. ANTIBIOTIKÁ: produkty plesní, proti zápalom,
14. ANTIDIABETIKÁ: proti cukrovke,
15. ANTIDIAROIKÁ: proti hnačke,
16. ANTIDYSMENOIKÁ: úprava bolestivej menštruácie,
17. ANTIEPILEPTIKÁ: proti epilepsii – antikonvulzíva,
18. ANTIIFLOGISTIKÁ: zmierňujú vnútorné zápaly,
19. ANTITUBERKULOTIKÁ: pri liečbe TBC,
20. ANTIHEMOROIDÁLIA: pri liečbe hemoroidov (zlatá žila),
21. ANTIHIDROTIKÁ: obmedzenie sekrécie potu (pri nadmernom potení),
22. ANTIHISTAMIKÁ: proti alergii,
23. ANTIKOAGULANCIÁ: znižujú krvnú zrážanlivosť,
24. ANTIMENORAGIKÁ: miernia krvácanie pri silnej menštruácii,
25. ANTINEURALGIKÁ: proti zápalom nervov,
26. ANTIPYRETIKÁ: proti zvýšenej telesnej teplote,
27. ANTIREUMATIKÁ: proti reume,
28. ANTISEPTIKÁ: ničia choroboplodné zárodky,
29. ANTISKLEROTIKÁ: proti vápenataniu tepien (napr. cesnak),
30. ANTITROMBOTIKÁ: pri zníženom zrážaní krvi,
31. ANTITUSIKÁ: zmiernenie kašľa,
32. AROMATIKÁ: voňavé látky, voňavé korigens,
33. PSYCHOLEPTIKÁ: lieky na pokojný stav mysle,
34. BALNEOLOGIKÁ: do osviežujúcich kúpeľov,
35. PSYCHOSTIMULANCIÁ: zvyšujú duševnú čulosť,
36. HEMOKATARITIKÁ: ako metabolitika, látková premena,
37. DERIVANCIÁ: dráždia kožu,
38. DEZINFICIENCIÁ: dezinfekčné prostriedky,
39. DEZODORANCIÁ: proti zápachu,
40. DERMATOLOGIKÁ: pri chorobách kože,
41. DIAFORETIKÁ: potopudné prostriedky,
42. DIURETIKÁ: pre vylučovanie moču obličkami,
43. EMENAGOGÁ: úprava nepravidelnej menštruácie,
44. EMETIKÁ: spôsobujú vracanie,
45. EMOLIENCIÁ: zmäkčujúce látky,
46. EXPEKTORANCIÁ: uľahčujú odkašliavanie,
47. GARGARIZMÁ: kloktadlá,

48. GYNEKOLOGIKÁ: pri ženských chorobách,
 49. HEMOKATARTIKÁ: prečisťujú krv,
 50. HEMOSTYPTIKÁ: zmierňujú krvácanie,
 51. HYPNOTIKÁ: uspávacie prostriedky,
 52. CHEMOTERAPEUTIKÁ: syntetické látky proti infekčné,
 53. HYPNOTIKÁ: znižuje krvný tlak,
 54. CHOLAGOGÁ: podporujú tvorbu žlče,
 55. INSEKTICÍDY: ničenie hmyzu,
 56. KARDIAKÁ: srdcové lieky:
 - kardoistimulanciá
 - kardiotoniká
 - kardiosedatíva,
 57. KARMINATÍVA: proti nadúvaniu,
 58. KONSPIRGENCIÁ: proti zliepavosti tabliet,
 59. KORIGENCIÁ: látky upravujúce chuť, vôňu, farbu,
 60. LAKTAGOGÁ: podporujú vylučovanie mlieka,
 61. LAXANCIÁ: preháňadlá,
 62. METABOLIKÁ: regulujú látkovú premenu,
 63. MUCILAGINOZÁ: slizotvorné, protizápalové,
 64. NERVÍNA: ovplyvňujú nervovú sústavu,
 65. OFTALMOLOGIKÁ: lieky pri očných chorobách,
 66. PARASYMPATIKOLYTIKÁ: uvoľňujú kŕče hladkého svalstva,
 67. PROFYLAKTIKÁ: ochranné látky, prostriedky, preventívne,
 68. NEUROTONIKÁ, TONIKÁ: látky posilňujúce organizmus,
 69. RUBEFICIENCIÁ: spôsobujú sčervenanie kože,
 70. SEDATÍVA: tlmia účinok na nervovú sústavu,
 71. STOMACHIKÁ: upravujú činnosť žalúdka,
 72. STOMATOLOGIKÁ: pri liečbe zubov,
 73. SYMPATIKOLYTIKÁ: tlmia účinky útrobného nervstva,
 74. UROLOGIKÁ: choroby močových ciest,
 75. VAZODILANCIÁ: látky rozširujúce cievy,
 76. VITAMINIFERUM: zdroj vitamínov,
 77. UTEROTONIKÁ: zosilňujú sťahy maternice, proti krvácaniu
- (http://referaty.atlas.sk/prirodne_vedy/chemia/6402/?page=1).

2.3.2 Prečo rastliny tvoria alkaloidy?

Je dokázané, že rastliny medzi sebou komunikujú, že si dokážu prejavit' sympatiu alebo antipatiu. Vo väčšine prípadov je to snaha o zachovanie druhu. Niektoré druhy rastlín sa navzájom znášajú, vzájomne podporujú, iné si naopak škodia. Sympatia alebo antipatia sa v rastlinnej ríši odborne nazýva alelopatia. Rastliny vylučujú do svojho okolia niektoré špecifické látky, ktoré sú produktom ich metabolizmu. Tieto výlučky môžu na inú rastlinu pôsobiť priaznivo alebo nepriaznivo. Môžu byť príčinou opadávania listov, kvetov, môžu urýchľovať dozrievanie alebo haniť klíčenie (WINK, 1999; PASTÝRIK, 1979).

Alelopatiu zväčša zapríčiňuje etylén, ktorý vylučujú zrelé plody, z nášho ovocia hrušky a jablká, z cudzieho banány (NĚMEC, PASTÝRIK, 1963).

Aj korene môžu vylučovať látky škodlivé pre iné rastliny. V niektorých poľnohospodárskych oblastiach východnej Ázie sadia cesnak voňavý (*Allium odorum*) do riadkov striedavo s riadkami hlávkovej kapusty, čím chránia jej korene pred hnilobou a chorobami. Intenzívny rast buriny pýru (*Agropyrum*), jeho premnožovanie a ničenie okolitej vegetácie sa čiastočne pripisuje aj tomu, že jeho korene vylučujú do pôdy fytónicidné účinné exkréty. Vlašský orech produkuje v zelených šupkách svojich plodov tanín, chemickú látku, ktorá pôsobí ako posol. Tanín je v určitej koncentrácii pre ľudí neškodná látka, zaručuje však dobrú ochranu opadaných plodov. Prírodzene zhoršuje pôdne podmienky na klíčenie semien iných druhov rastlín. Tie potom klíčia len veľmi ťažko. Vlašský orech sa touto obdivuhodnou vlastnosťou stará o to, aby vytvoril čo najlepšie podmienky na rozmnožovanie výlučne iba svojim potomkom, klíčky iných druhov rastlín sú decimované. Udržiava si stanovište bez neželaných rastlín, burín a iných stromov. Túto seba ochranu môžeme označiť ako starostlivosť o potomstvo.

K aleopatii môžeme priradiť aj telemorfiu, t. j. úkaz, že za normálneho vývinu môžu na seba morfogénne pôsobiť časti jednej rastliny alebo samostatné jedince toho istého druhu zlúčeninami, vylučovanými do plynného alebo tekutého prostredia. Telemorfiu môžeme najlepšie sledovať u Mucorieneae, a to pri heterotalických druhoch, ktoré majú samčie a samičie mycéliá. Nelíšia sa od seba morfológicky. Zygoty vznikajú len vtedy, keď sa stretnú hýfy samčieho a samičieho pohlavia. Samčie rastliny vylučujú látky, ktoré sa šíria vzduchom, vodou, agarom a zapríčiňujú, že samičie hýfy tvoria veľmi nápadné zygoty (NĚMEC, PASTÝRIK, 1963).

Ďalšou z príčin, prečo sa v rastlinách syntetizujú alkaloidy, je aj parazitizmus. Parazitizmus je vzťah medzi organizmami, v ktorom príživník (parazit) odoberá hostiteľovi živné substancie bez toho, aby mu poskytol nejaký úžitok. Hostiteľ sa poškodzuje, slabne a je

až usmrtený. Parazit často haustóriami vniká do tela hostiteľa, vylučuje toxíny a odoberá mu látky potrebné pre svoje životné procesy. Rastliny sa prirodzenou cestou bránia proti prenikaniu parazita do ich tela. Umožňujú im to rozličné látky, ako kutín, subertín, kyselina kremičitá, triesloviny, jedovaté látky, kyseliny a pod. (ŠVIHRA a kol., 1989).

Ľudia si napríklad odjakživa kládli otázku, prečo niektoré huby obsahujú jedy. Veľmi často to pripisovali zlým úmyslom nejakej vyššej moci (diabla, bosoriek, čarodejníkov). A odjakživa hľadeli na huby s podozrením, aj keď to často bol ich jediný zdroj potravy a mnohé používali aj v ľudovom liečiteľstve. Prečo sú teda huby jedovaté? Huby nie sú jedovaté nám napriek ani za trest. Rástli dávno pred človekom a nech ich jedy slúžili na čokoľvek, s nami to veľmi nesúviselo. Nevieme celkom presne, prečo niektoré druhy húb tvoria tie veľmi zložité molekuly bielkovín, ktoré nášmu organizmu tak nesvedčia. Podľa niektorých teórií sa takto huby bránia pred živočíchmi, ktoré ich ohrýzajú, to však nemusí byť pravda, pretože hmyzu a slimákom mnohé z týchto jedov neškodí. Podľa iných teórií huby vylučujú jedovaté látky do svojho okolia, aby sa zbavili konkurentov v pôde, najmä baktérií a iných húb. A podľa ďalších teórií sú toxíny húb jednoducho vedľajšími produktmi ich metabolizmu, možno sú to odpadové látky. Iba v posledných rokoch vedci začínajú zisťovať, že podobne ako jedy niektorých rastlín aj jedy húb môžu byť zdrojom cenných liečiv. Preto by huby, aj tie jedovaté, namiesto strachu a odporu mali vzbudzovať skôr náš obdiv a záujem.

Rastliny produkujú signálne látky ako výstrahu pred prirodzenými nepriateľmi. Stromy s poškodeným lístím po napadnutí hmyzom alebo ohrýzaním zverou dávajú pomocou chemických signálnych látok, ktoré uvoľňujú do vzduchu, podnet, aby ostatné stromy v ich okolí začali produkovať zodpovedajúce obranné látky (AGRIOS et al., 2005).

Ekológovia a chemici z univerzity v Seattle v americkom štáte Washington skúmali lesy, o ktorých bolo známe, že ich približne každých desať rokov škodce takmer úplne obžrali. Výskumníci zistili, že obrovské množstvá hmyzu zamierili na nespočetné množstvo briez a vrb, na ktorých spôsobili holožer. Aj keď ešte rozsiahle zdravé porasty so zdravým lístím „čakali“ na hmyz, žiadne ďalšie stromy už neboli napadnuté. Ďalej bolo pozoruhodné, že tento žravý hmyz po masívnych útokoch postupne hynul – pravdepodobne hladom – ale v prirodzených intervaloch desiatich rokov sa znova premnožil. Čo sa v týchto lesoch dialo? Výsledky laboratórnych pokusov ukázali, že stromy sa úspešne bránili pred hmyzom. Pozmenili chemické zloženie svojich listov natoľko, že sa ich výživná hodnota znížila a zmenila sa aj ich chuť. Stromy boli dokonca schopné zmeniť bielkovinové zloženie svojich listov. Takýmto spôsobom sa dokázali zbaviť žravých nepriateľov. Tento trik na zachovanie života je známy aj u vlčieho bôbu. Produkuje jedovaté látky, ktoré účinkujú nielen proti voškám, ale dokonca znižujú aj spásanie ovcami a kozami.

Ešte udivujúcejší bol výsledok projektu, v ktorom nasadili na výskumné stromy húsenice výnimočne žravého druhu. Stromy aj v tomto prípade dosiahli, že ich lístie bolo nestráviteľné a málo výživné. Keď aj stromy kontrolnej skupiny, ktoré nejaký škodca nenapadol, pozmenili chemické zloženie svojho lístia, vedci predpokladali, že informácia sa šíri dotýkajúcimi sa koreňmi. Keď však rovnako reagovali aj stromy vo vzdialenosti 100 metrov, ubezpečili sa, že signály museli byť vyslané pomocou voní vzdušnou cestou, aby tak varovali iné stromy. Ako poslíčka takto identifikovali rastlinný hormón, plyn etylén. Rastliny sa teda prirodzene bránia aj voči živočíchom. Zvieratá dobre vedia, čo je pre ne dobré ako potrava, čo im pomôže prekonať zdravotné problémy, čo poslúži ako prevencia a tiež, čomu je treba sa vyhnúť (väčšinou ide o inštinktívne chovanie, zlú chuť alebo zápach stravy). Aj napriek tomu sa pravidelne vyskytujú otravy zvierat jedovatými rastlinami. Existuje množstvo rastlín bez akýchkoľvek pochybností toxických pre zvieratá. Asi nie je potrebné pochybovať o jedovatosti tisu pre kone, keď boli tieto mŕtve zvieratá nájdené ešte s tisovou vetvou v hube kúsok od rastliny. Akútne otravy zvierat bývajú častejšie na začiatku pastevnej sezóny a u mladších kusov. Väčšie nebezpečenstvo otravy hrozí u vyhľadovaných zvierat a pri pastve na novom mieste s menej známymi druhmi rastlín. Prevažne v malochove sa stáva, že akútnu otravu spôsobí spásanie rastlín okrasných, parkových, a lesných (NOVÁK, 2007).

2.3.3 Klasifikácia alkaloidov

Alkaloidy sú organické dusíkaté zásady, ktoré sa tvoria v niektorých rastlinách a vyznačujú sa špecifickými fyziologickými, často toxickými účinkami pre živočíchov a človeka (WINK, 1999; PASTÝRIK, 1979).

Alkaloidy nie sú produktmi priamej hydrolýzy bielkovín, vo väčšine prípadov majú zložitú štruktúru a vyznačujú sa silnými fyziologickými účinkami. V rastlinnom, prípadne v živočíšnom organizme sa nachádzajú v hotovej forme, t.j. sú produktmi životných procesov týchto organizmov. Vyskytujú sa v rôznych druhoch asimilujúcich rastlín, zväčša vo vyšších krytosemenných rastlinách, jednoklíčnych ale najmä v dvojklíčnych, v čeľadiach *Amaryllidaceae*, *Apocynaceae*, *Berberidaceae*, *Buxaceae*, *Cactaceae*, *Celastraceae*, *Fabaceae*, *Fumariaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*. Výnimočne boli zistené v rastlinách nahosemenných, v hubách, prasličkách a plavúňoch.

Z chemického hľadiska sú alkaloidy okrem nepatrných výnimiek látky tuhé (tekutý je koniín, nikotín, sparteín) a bezfarebné (žltý je berberín). Bázy sú opticky aktívne (neaktívny je papaverín), a to prevažne ľavotočivé (pravotočivý je cinchonín). Alkaloidy ako zásady tvoria s kyselinami kryštalické soli (sírany, chloridy), ktoré sú rozpustné vo vode. preto sa v praxi viac používajú než voľné zásady, ktoré sú vo vode ťažko rozpustné alebo úplne nerozpustné. Zásady sa však rozpúšťajú v organických rozpúšťadlách. Získavajú sa izoláciou z rastlinného materiálu. Niektoré boli pripravené synteticky. Takmer všetky alkaloidy sa zrážajú rozličnými činidlami z roztokov svojich solí, napríklad Majerovým činidlom, kyselinou fosfomolybdénovou, roztokom tanínu, chloridom ortuťnatým, kyselinou pikrovou a pod. Kvalitatívne sa určujú charakteristickými farebnými reakciami.

Alkaloidy rozdeľujeme najčastejšie podľa heterocyklu, ktorí tvorí základ ich štruktúry, napr. na alkaloidy s cyklom pyridínu (nikotín, konín, piperín), s cyklom chinolínu alebo izochynolínu (chinín, papaverín, morfín, kodeín atď.), s cyklom indolu (strychnín, ergotamín) (http://www.gymjsbj.sk/texts/web_chemia/download/alkaloidy.doc).



Obr. č.6 Plod ľuľkovca zlomocného - jedovatá bobuľa
(*Atropa bella-donna* L.)



Obr. č.7 Fialka voňavá
(*Viola odorata*)



Obr. č. 8 Kvet durmanu obyčajného
(*Datura stramonium*)



Obr. č. 9 Baza čierna
(*Sambucus nigra*)



Obr. č. 10 Kvet lykovca jedovatého
(*Daphne mezereum*)

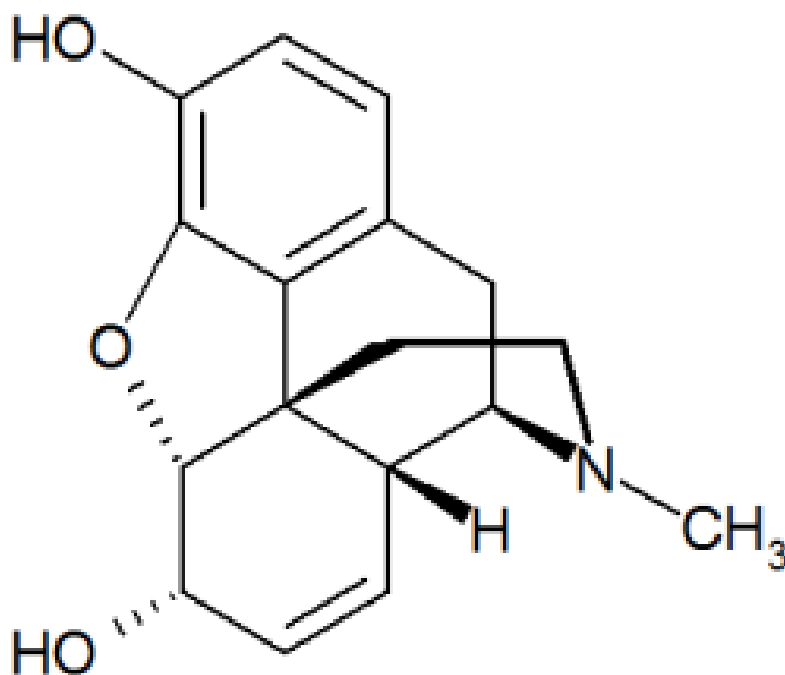


Obr. č.11 Kvet konvalinky voňavej
(*Convallaria majalis*) (<http://www.byliny.sk/>)

Rozdelenie alkaloidov podľa štruktúry:

Fenyletylamínová skupina: Do tejto skupiny patrí mnoho známych zlúčenín, izolovaných z prírodného materiálu alebo získaných synteticky, napr.: Efedrín $C_{10}H_{15}ON$ sa vyskytuje v tropickom kře (*Ephedra vulgaris*), z ktorej bol aj prvý raz izolovaný. Z chemického hľadiska je efedrin 1-fenyl-2-metylamino-1-propanol. Jeho fyziologická účinnosť je podobná adrenalínu, t.j. zvyšuje krvný tlak, dráždivo pôsobí na nervový systém. Efedrín sa vyrába synteticky. Používa sa ako sympatomimetikum, antiastimatikum a v očnom lekárstve.

Fenantrénová skupina: Do tejto skupiny zaraďujeme alkaloidy z ópia získaného z vysušenej šľavy nezrelých makovic maku. Morfín bol izolovaný ako prvý alkaloid. Málo rozpustný vo vode v éteri, octane etylovom a v benzéne. Morfín a jeho soli sú toxické. Jeho soľ s HCl má rozsiahle použitie v lekárstve. Používa sa ako narkotikum, respektíve sedatívum. Je návykový, vo väčších dávkach môže zapríčiniť smrť (<http://referaty.hladas.sk/referat.php/-alkaloidy/14/1142>).



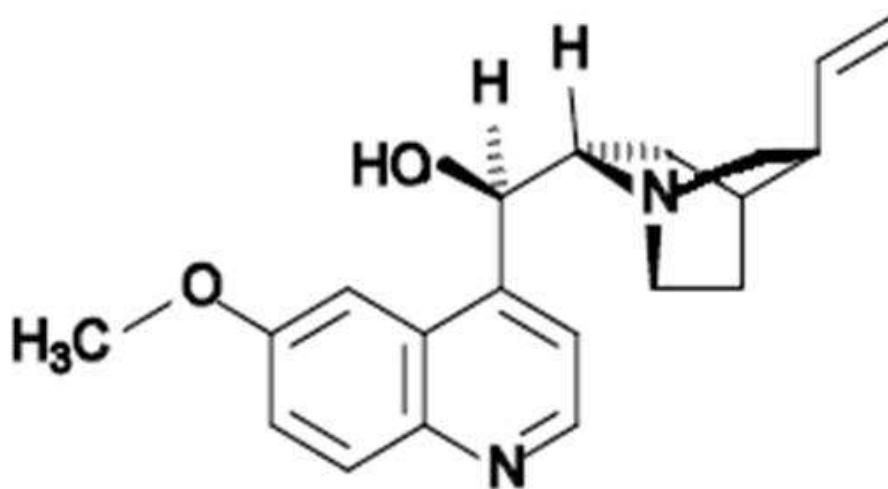
Obr. č.12 Štruktúrny vzorec morfínu

(<http://www.bristol.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol.htm>)

Imidazolinová skupina: Najdôležitejší alkaloid tejto skupiny je pilokarpín, nachádzajúci sa v rastline (*Pilocarpus Jaborandy*), používa sa v očnom lekárstve. Znižuje vnútorný tlak oka a zužuje zreničky.

Pyrolidínová skupina: Sem patria alkaloidy, ktoré obsahujú pyrolidínove jadro napr. Hygrín, Gramín. Pyridínová a pyrolidín-pyridínová skupina. Medzi najznámejšie alkaloidy tejto skupiny patria koniín, lobelín, piperín a nikotín. Nikotín $C_{10}H_{14}N_2$. Alkaloid s heterocyklicky viazaným dusíkom 3-(1-metyl-2-pyrolidiny) pyridín. Je najznámejší a najviac rozšírený alkaloid tabaku. Vyskytuje sa v listoch a semenách tabaku súčasne s inými príbuznými látkami. Nikotín je prudký jed. V malých dávkach zvyšuje krvný tlak a povzbudzuje činnosť centrálného nervového systému, vo väčších dávkach tlmí prenos vzruchov vo vegetatívnom nervovom systéme, zapríčiňuje poruchy dýchania a ochrnutie srdcovej činnosti. Pyrolidín - piperidínová skupina. Do tejto skupiny patrí mnoho známych zlúčenín napr.: atropín, skopolamín, kokaín atď. Atropín $C_{17}H_{23}NO_3$ – alkaloid s heterocyklicky viazaným dusíkom.

Chinolínová a izochinolínová skupina: Najznámejší alkaloid s chinolínovým kruhom je chinín $C_{20}H_{24}N_2O_2$. Nachádza sa v kôre subtropických stromov, napríklad v kôre chinovníka. Chinín je biely amorfny prášok málo rozpustný vo vode, dobre rozpustný v éteri a alkohole. Používa sa v medicíne ako antipiretikum a chemoterapeutikum pri liečení malárie. Medzi tieto alkaloidy patria aj strichnínové alkaloidy a papaverín, kurárové alkaloidy. Kurárové alkaloidy sa nachádzajú najmä v rastlinách chindodendrón tomentosum, strichnos toxifera, ktoré pochádzajú z Južnej Ameriky. Surové extrakty z týchto rastlín používali domorodci na otravovanie hrotov šíпов. Papaverín - je to kryštalická látka horkej chuti nerozpustná vo vode, dobre rozpustná v chloroforme. Papaverín pôsobí slaboo narkoticky a pre proti kľčové účinky sa používa ako spazmolitikum. Vyskytuje sa v šľave nezrelých makovic maku siateho (*papaver somniferum*) (<http://referaty.hladas.sk/referat.php/-alkaloidy/14/1142>).



Obr. č.13 Štruktúrny vzorec chinínu

(<http://images.google.sk/imgres?imgurl=http://kekule.science.upjs.sk/ekologia>)

Tropínová skupina: Alkaloidy tejto skupiny obsahujú vo svojej molekule ako základ bicyklický systém, ktorý vznikol kondenzačným spojením pyrolidínu a piperidínu. Nahradením vodíka v polohe 8 metylovou skupinou vznikne základná zlúčenina tropán, od ktorej sa substitúciou vodíka v polohe 3 skupinou – OH odvodzuje sekundárny alkohol tropín. Na tropíne sú založené farmaceuticky dôležité alkaloidy: atropín, skopolamín a kokaín. Atropín sa nachádza v mnohých rastlinách čeľade *Solanaceae* – Ľuľkovité. Atropín je ester tropínu s kyselinou D,L-tropovou (kyselinou 2-fenyl-3-hydroxypropiónovou). Je to biely kryštalický prášok, prudko jedovatý, dráždivej chuti. Používa sa v očnom lekárstve (rozširuje zrenicu), na uvoľnenie kŕčov, často v kombinácii s inými liečivami. Skopolamín = hyoscín sa vyskytuje v rozličných rastlinách čeľade *Solanaceae*. Je to biely kryštalický prášok, ktorý na vzduchu stráca kryštalickú vodu. Má podobný účinok ako atropín. Na zrenicu však pôsobí intenzívnejšie. S analgetikami (C) slúži na predoperačnú prípravu. Kokaín je hlavným alkaloidom listov kra (*Erythroxylon coca*) koka pravá, rastúceho v Južnej Amerike a na Jáve. Je jedným z najdlhšie známych alkaloidov. Chemicky je kokaín dvojnásobný ester ekgonínu s metanolom a kyselinou benzoovou. Uvádza sa ako chlorid kokaínu – *Cocainium chloratum*. Je to kryštalický prášok dobre rozpustný vo vode. Kokaín je účinné miestne anestetikum (D). Podlieha ópiovému zákonu. Dosiaľ sa používa v očnom lekárstve vo forme roztoku na povrchovú anestézu (<http://referaty.hladas.sk/referat.php/-alkaloidy/14/1142>).

Dlhodobým zneužívaním niektorej drogy vzniká buď závislosť somatická alebo psychická alebo obidve. Psychickou závislosťou rozumieme zvláštne ladenie psychiky, ktorá núti jedinca k periodickému alebo sústavnému požívaniu látky. Užívateľ tak činí preto, aby si navodil príjemný psychický stav alebo aby zabránil vzniku nepríjemných pocitov. Závislosť somatická znamená adaptáciu organizmu na požívanú látku. Príde k tomu, že užívaná látka sa stane nutnou súčasťou metabolizmu a jej vynechanie vedie k vzniku abstinenčných príznakov (JANÍK, DUŠEK, 1990).

2.3.4 Druhové zastúpenie rastlín produkujúcich alkaloidy

Na našom území rastie približne 400 druhov rastlín s rôznym stupňom jedovatosti. Stupeň jedovatosti sa môže v jednotlivých častiach, resp. v niektorých štádiách rastu meniť. Jedovatosť niektorých rastlín podmieňujú špecifické obsahové látky, ktoré môžu byť prítomné v celej rastline alebo len v niektorej jej časti, najmä v plodoch. V jedovatej rastline sa s pravidla nachádza viacej jedov. Zvyčajne sú to:

- alkaloidy - zásadité látky s obsahom dusíka,
- glykozidy - organické zlúčeniny obsahujúce jedovatý aglykón, ktorý sa viaže na cukornú zložku,
- toxalbumíny – látky príbuzné bielkovinám, obsiahnuté v niektorých druhoch húb, ale aj v agáte a ďalších zelených rastlinách,
- jedovaté saponíny – napr. kúdeľ a vranie oko, časť saponínov sa využíva i liečebne,
- jedovaté silice – napr. borievka netata ,
- jedovaté živice – napr. posed čierny, posed červený,
- jedovaté horčiny – napr. zimozelen, rododendron a šalát jedovatý (KRESÁNEK, 1988).

2.3.4.1 Tis

Tis (*Taxus*) je pamätný strom smútočného vzhľadu, ktorý v minulosti aj na našom území vytváral súvislé lesy, o čom svedčia mnohé miestne názvy: Tisov, Tisovo, Tisovec, Tisa a pod. Na rozdiel od iných ihličnanov tis neobsahuje živice na báze fenolických uhl'ovodíkov. Tisy patria do rovnomennej triedy Tisy – *Taxospida* a do čeľade Tisovité – *Taxaceae*. Patrí sem päť rodov a pätnásť druhov. Celkovo existuje asi osem druhov, ktoré sú si veľmi podobné a sú rozšírené na severnej pologuli.

V našich podmienkach sa sadovnícky využívajú nasledovné druhy (CHARLWOOD et al, 1990):

- *Taxus baccata* L. – Tis obyčajný (červený),
- *Taxus brevifolia* NUTT. – Tis západoamerický
- *Taxus canadensis* MARSH. – Tis kanadský
- *Taxus celebica* (WURBURG) LI. – Tis čínsky
- *Taxus cuspidata* S. et Z. – Tis japonský
- *Taxus hunnevelliana* REHD. – Tis hunnewellov
- *Taxus × media* REHD. – Tis prostredný



Obr. č.14 Plody tisu kanadského
(*Taxus canadensis*)



Obr. č.15 Kôra tisu prostredného
(*Taxus × media*)



Obr. č.16 Vetvička tisu obyčajného
(*Taxus baccata* L.)



Obr. č.17 Ihličie tisú západoamerického
(*Taxus brevifolia*)



Obr. č.18 Tis obyčajný
(*Taxus baccata* L)

(<http://www.garten.cz/e/sk/1031-tis-obycajny-taxus-baccata>)



Obr. č.19 Tis hunnewellov
(*Taxus hunnebelliana*)

NOVAK (1990) charakterizuje tis ako nižší strom, ktorý dorastá do výšky 5 - 15 (17,5) m, často len viackmenný rozložito zakonárený ker. Koruna je kuželovitá až nepravidelná. Konáre sú za mlada v nepravidelných praslenoch, neskôr takmer vodorovne odstávajú. Kôra je červenohnedá až sivohnedá. Borka sa odlupuje v pomerne tenkých podlhovastých nepravidelných sivasto červenohnedých platničkách. Kmeň je často pozdĺžne valcovitý s laločnatým priebehom letokruhov. Nápadné sú hojné adventívne výhonky, ktoré sa tvoria na kmeni už pri náhlejšom osvetlení, ale najmä pri jeho poškodení. Má silnú pňovú výmladnosť (DUŠEK, DUŠKOVÁ, 1997).

U starších jedincov je kmeň pomerne silný a má výraznú načervenalú alebo červenohnedú borku. Semenáče vytvárajú kmeň, prípadne niekoľko kmienikov súčasne. Pri množení odrezkami sa kmeň nevytvára, rastú vždy ako kry. Koreňový systém dobre zaisťuje drevinu v pôde (KIM et al, 2002).

Púčiky majú 3-4 x 2 mm, sú široko vajcovité, tupé, červenkasto hnedé. Výhonky sú svetlozelené, neskôr svetlohnedé potom červenkasto hnedé, lysé. Ihlice sú 20-30 x 2-2,5 mm veľké, čiarkovité, končisté, ploché, mäkké, na báze náhle zúžené do krátkej stopky, ktorá zbieha po konárik. Na vrchnej strane sú tmavozelené, lesklé, na spodnej žltozelené, matné. Sú špirálovito rozmiestnené (KAMENICKÁ, VIZÁROVÁ, 2000).

Ihličie tisov je rôzne dlhé, napr. u rôznych kultivarov *T. baccata* ma dĺžku 5-40 mm. Rovnako sa u kultivarov vyskytuje aj rôzne sfarbenie ihličia, od tmavozeleného až modrozeleného, cez svetlozelené až po žlté. Vytrvávajú 6-8 rokov (KIM et al, 2002).

Dvojdómá, výnimočne len jednodómá (*f. monoica*) rastlina. Samčie šištinky majú 3 mm, sú guľaté, krátkostopkaté, žlté, s 8-10 tyčinkami, viditeľné už v jeseni v pazuchách ihlíc, husto zoskupené na spodnej strane konárikov. Samičie šištinky sa podobajú štíhlym púčikom, majú jedno koncové priame vajíčko s mikropylou, ktoré je obalené párnami protistojných šupín (KAMENICKÁ, VIZÁROVÁ, 2000).

Samčie jedince kvitnú prvýkrát asi v 10. roku života, samičie asi o desať rokov neskôr. Kvitnutie prebieha v marci a apríli. Plod je spočiatku zelený, koncom leta najčastejšie krvavo červený miešok (nejedovatý), veľkosti 5-7 mm, obsahujúci semeno. Miešky môžu byť niekedy svetločervené (*T. canadensis*) alebo žlté (niektoré kultivary *T. baccata*) (KIM et al, 2002).

Semeno má 6-8 x 5 mm, je oválne, vajcovité, prihrotené, jemne stlačené, s 2-4 hranami a tmavohnedým pevným osemením. Je obklopené pohárikovitým rôsolovitým karmínovočerveným (výnimočne žltým) mieškom, ktorý je požívateľný, kým ostatné časti obsahujú jedovatý alkaloid taxín. Dozrieva v auguste až septembri (NOVAK, 1990).

Sadovnícky predstavujú veľmi významné stálezelené dvojdomé stromy alebo kry. Patria medzi najdlhšie žijúce dreviny vôbec. Ich cennosť je daná najmä ich znášanlivosťou k hlboko zatieneným stanovištiam, vynikajúcou regeneračnou schopnosťou po reze a poškodení, nenáročnosťou a odolnosťou k znečistenému prostrediu (VODRÁŽKA, 1992).

Niektoré pôvodné druhy vytvárajú v staršom veku stromovitý habitus, u kultivarov a variet prevládajú krovité tvary. V mladosti niektoré druhy a typy pripomínajú jedľu (obzvlášť Tis obyčajný). Všetky druhy rastú veľmi pomaly, vo veku 10 rokov sú asi 1 m vysoké, vo veku 30 rokov 3-5 m (KIM et al, 2002).

Nielen zo sadovníckeho hľadiska je významné poznanie habituálnych typov, ktoré sú dôležité pre poznanie charakteru aj intenzity rastu, ktoré zohrávajú pri plantážnickom pestovaní nemalú úlohu (KIM et al, 2002).

- „*baccata*“ – nízky stromovitý typ so širokou, trochu nepravidelnou, prevažne vajcovitou až guľovitou korunou. Konáre vystupujú viac-menej vodorovne, alebo mierne šikmo nahor, sú rôznej dĺžky, takže obrys koruny je nepravidelne riedky.
- „*pendula*“ – pomerne bujne rastúci stromček s konármi previsnutými pozdĺž kmeňa, vetvičky tiež previsnuté.
- „*gracilis*“ – krovitý typ s riadne vyvinutým vzpriameným vrcholom a ovisnutými vetvičkami
- „*cuspidata*“ – pomerne riedko stavaný ker s rozložito vystúpavými konármi, vzdušný, riedky, pologulovitý.
- „*overeynderi*“ – veľmi široký ker s dosť rovnomerne vzpriamene rozmiestnenými konármi, hustý.
- „*fastigiata*“ – široko stĺpovitý typ, konáre už od zeme rozvetvené, zväzkovito usporiadané, husto rozložené.
- „*erecta*“ – husté kry, široko kužeľovito pretiahnuté, s výrazne zúženými vrcholmi.
- „*expansa*“ – nízky, nepravidelne rastúci ker, so strnulo šikmo vystupujúcimi konármi a konárkami, niekedy má rozstrapatený charakter.
- „*compacta*“ – nízky ker, pomerne husto a pravidelne guľovitý, s viditeľnými kmienkami nízko nad zemou.
- „*repandens*“ – zakrpatený, rozložitý, poliehavý ker, hlavné konáre vodorovné, konáriky prevísajúce.

Pre plantážnické pestovanie s požiadavkou na vysokú tvorbu nadzemnej hmoty ihličia, nevyhovujú nízko rastúce formy „*expansa*“, „*compacta*“ a „*repandens*“, ani riedke formy ako je napr. „*cuspidata*“. Z hľadiska zberu nevyhovujú ani previsnuté formy „*pendula*“ a „*gracilis*“, kde by sa zber značne sťažil. Pre plantážnické pestovanie tisov pre zber ihličia na farmaceutické účely sa ako vhodné javia habituálne formy „*baccata*“, „*overeynderii*“, „*fastigiata*“ a „*erecta*“. Tis tvorí viacero foriem a odrôd podľa habitu, dĺžky, tvaru a sfarbenia ihlíc (NOVAK, 1990).

Podľa habitu:

- Kuželovité až stĺpovité: ‘Cheshuntensis’, ‘Fastigiata’, ‘Fastigiata Robusta’, ‘Fastigiata Viridis’, ‘Overeynderii’
- Previsnuté: ‘Dovastoniana’, ‘Graciosa’, ‘Gracilis Pendula’, ‘Jackosonii’
- Kríkovité: ‘Adpressa’, ‘Adpressa Pyramidalis’, ‘Adpressa Stricta’, ‘Erecta’, ‘Imperialis’, ‘Linearis’, ‘Nissen’s Corona’, ‘Nissen’s Kadett’, ‘Nissen’s Page’, ‘Nissen’s President’, ‘Nissen’s Regent’,
- Nízke, trpasličie, (zakrpatené): ‘Amersfoort’, ‘Bixtonensis’, ‘Cavendishii’, ‘Compacta’, ‘Decora’, ‘Epacrioides’, ‘Ericoides’, ‘Horizontalis’, ‘Knirps’, ‘Nutans’, ‘Prostrata’, ‘Repandens’

Všetky časti tisú okrem obalov plodov (bobule) sú prudko jedovaté pre alkaloid "taxin", ktorý je horkej chuti a je prudko, až smrteľne jedovatý pre väčšinu teplokrvných živočíchov. Spôsobuje ochrnutie dýchacích orgánov a poškodzuje cievy. Smrť nastáva po použití 30 g ihličia u psov a sliepok, 75 g u ošípaných, 500 g u hovädzieho dobytku a 100 g u koňa. Kozy a králiky sú voči nemu odolné.

Tis sa v ľudovom liečiteľstve využíval proti epilepsii a pri menštruačných ťažkostiach. V dávnejšej dobe sa jeho výhonky používali na liečenie besnoty, ale pre spomínaný alkaloid sa od toho upustilo. Okrem jedovatých alkaloidov obsahujú ihličky a kôra tisú aj látku účinnú proti rakovine, ktorá sa nazýva Taxol. Progresívny vstup Taxolu a jeho analógov do procesu tvorby antileukemických a protinádorových preparátov, podmienil vybrané pracoviská do koordinovaného úsilia o aktívny vstup do rozpracovania selekčných, pestovateľských a technologických podmienok využitia rastlinného druhu *Taxus baccata* L. (FILOVÁ, MIKLÁŠOVÁ, SKRZYPEK).

Taxol, ktorý sľuboval pomoc pri liečbe rakoviny, bol objavený v 60-tych rokoch 20. storočia a popísaný v roku 1971. Extrakty z viac ako 35 000 rastlín sa zbierali na testovanie. *Taxus brevifolia*, ktorý rastie v miernej oblasti bol prvý objavený druh, ktorý obsahoval

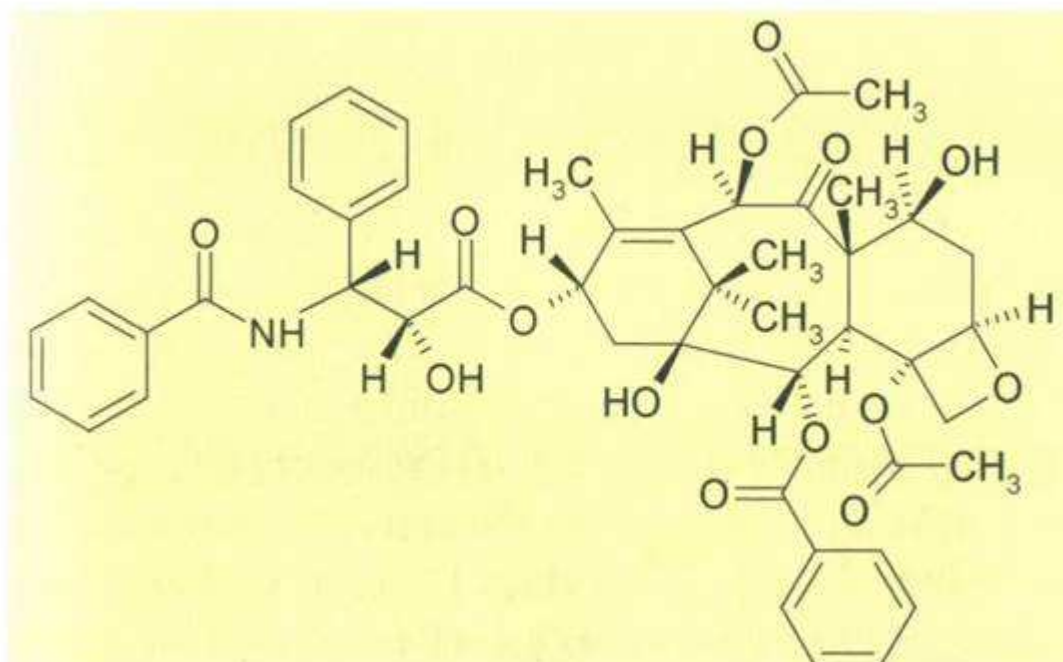
protirakovinové látky, a z ktorého boli tieto látky aj izolované. Mali však sami o sebe veľmi nízke zastúpenie v extraktoch, ktoré boli izolované z kôry tisového dreva. Na produkciu 1kg taxolu musí byť obetovaných asi 3000 stromov, alebo zhruba jeden alebo dva stromy na každú liečbu (SHIMOMURA et al, 1997).

Mnoho ľudí, združení, ale aj celých štátov bolo proti ničeniu stromov a krov, kvôli ochrane životného prostredia a v neposlednom rade aj zachovaniu živočíšnej ríše v týchto lesoch. Neskôr sa našiel správny spôsob pestovania krov a začali sa zakladať pestovateľské plochy (škôlky), na ktoré sa vysádzali sadenice tisú. Kry (stromčeky) sa každoročne prerezávali a tak sa pripravili nízke, husté a pevné rastliny, ktoré sú požadované trhom (ZENK, 1991).

Dr. Edward M. Croom Jr. z Univerzity v Mississippi, ktorý sa týmto problémom zaoberal, zistil, že pre okrasné druhy tisú je primárnym zdrojom Taxolu ihličie, zatiaľ čo kôra je zdrojom pre pôvodné lesné druhy tisú. Efektívnym a ekonomickým spracovaním odrezkov sa dosiahol obnoviteľný zdroj Taxolu (SHIMOMURA et al, 1997).

Najväčšiu zbierku druhu *Taxus* bol v arboréte – botanickej záhrade Chadwicka Livinga. Dr. L. C. Chadwick a jeho absolvent univerzity vysokoškolák Raymond A. Keen zhromaždili do roku 1942 viac než 100 odrôd tisú. Hľadali sa najvhodnejšie odrody *Taxus* s najlepšimi vlastnosťami, aby sa z neho mohli izolovať maximálne množstvá Taxolu. Známym pôvodným výrobným procesom - syntézou sa vyrábal predchodca Taxolu, 10 - deacetylbaaccatin III. Ten bol úspešne používaný na produkciu taxolu, ktorý bol do tej doby identifikovaný ako paclitaxel. Taxol bol oficiálne zapísaný obchodným menom a formulovaný ako liek. Primárny zdroj Taxolu 10-deacetylbaaccatin III, sa našiel v obnoviteľnej biomase (vetvičkách a ihličí) v európskom druhu tisú (*Taxus baccata*) a v himalájskom druhu tisú (*Taxus wallichiana*) (SHIMOMURA et al, 1997).

Taxol podporuje formovanie mikrotubúl z tubulínu. Droga sa spája s tubulínovými dimérmi, redukuje kritickú koncentráciu tubulínu potrebného na polymerizáciu a zvyšuje úroveň a rýchlosť polymerizácie. Taxol umožní mikrotubulám zhromaždenie v nepriaznivých podmienkach a tieto mikrotubuly sú abnormálne rezistentné k depolymerizácii. Bunky vystavené taxolu majú abnormálnu morfológiu cytoskeletu, čo poukazuje na jeho cytotoxicitu. Tá je pravdepodobne spôsobená mikrotubulami sprostredkovaným prerušením mitózy. V predklinických skúškach vykázal taxol preukaznú antineoplastickú aktivitu. Početné bunkové línie a ľudské tumory sú citlivé k taxolu. Navyše, klinické štúdie potvrdili, že pacienti s množstvom malígnych nálezov reagovali na liečenie taxolom. Taxol je efektívny pri liečení karcinómov vaječníkov a pravdepodobne aj iných zhubných nádorov (ZENK, 1991).



Obr. č.20 Štruktúrny vzorec taxolu

(<http://www.bristol.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol.htm>)

2.3.4.2 Časová a priestorová produkcia taxánov

SEVON et al. (2002) použili štyri rozličné variety *Taxus baccata* a *Taxus × media* na skúmanie produkcie taxolu a štyroch ďalších taxánov počas vývoja výhonkov. Hoci úroveň obsahu taxolu medzi jednotlivými varietami je rozdielna, obsah narastá na štvornásobok medzi pučaním a plným predlžovacím rastom púčika. Zaujímavé je, že počas periódy najväčšieho rastu a predlžovania výhonkov, narástla taktiež produkcia taxánov. Tieto údaje naznačujú, že počas primárneho rastu vynakladá rastlina aj energiu na sekundárne komponenty.

MASSOT et al. (2000) analyzovali obsah taxánov v Tise západnom. Analýza extraktov z kôry a olistenia poukázala na gradient klesajúcej koncentrácie od bázy kmeňa k vetvám. Tento pokles je spôsobený všeobecne vyšším obsahom taxánov v pletivách floému a poklesu hrúbky vo vnútornej kôre od bázy kmeňa ku koncu vetiev.

Obsah taxánov sa sledoval aj v časovej sfére. Kým v kôre narastal obsah od mája do augusta, v ihličí bol zhruba konštantný. Neplatilo to pre obsah baccatinu III, ktorého obsah v ihličí narastal podobne ako v kôre, a brevifoliol, ktorý narastal od mája do augusta 9-krát rýchlejšie než v kôre.

2.3.4.3 Získavanie a využitie taxolu

Jedným z viacerých sľubných alternatív je produkcia biomasy tisov. Myšlienkou pestovania tisov pre farmaceutické využitie sa začal v USA už v osemdesiatych rokoch 20. storočia zaoberať WEYERHAEUSER. Pre úspech tejto práce sa snažil optimalizovať faktor obsahu taxánov s úrovňou produkcie biomasy za jednotku času na jednotku priestoru a dosiahnuť tak ekonomicky efektívnu cestu. Vystupujú aj snahy o cieľavedomé šľachtenie na vysoký obsah účinných látok (CHILTON et al, 1982).

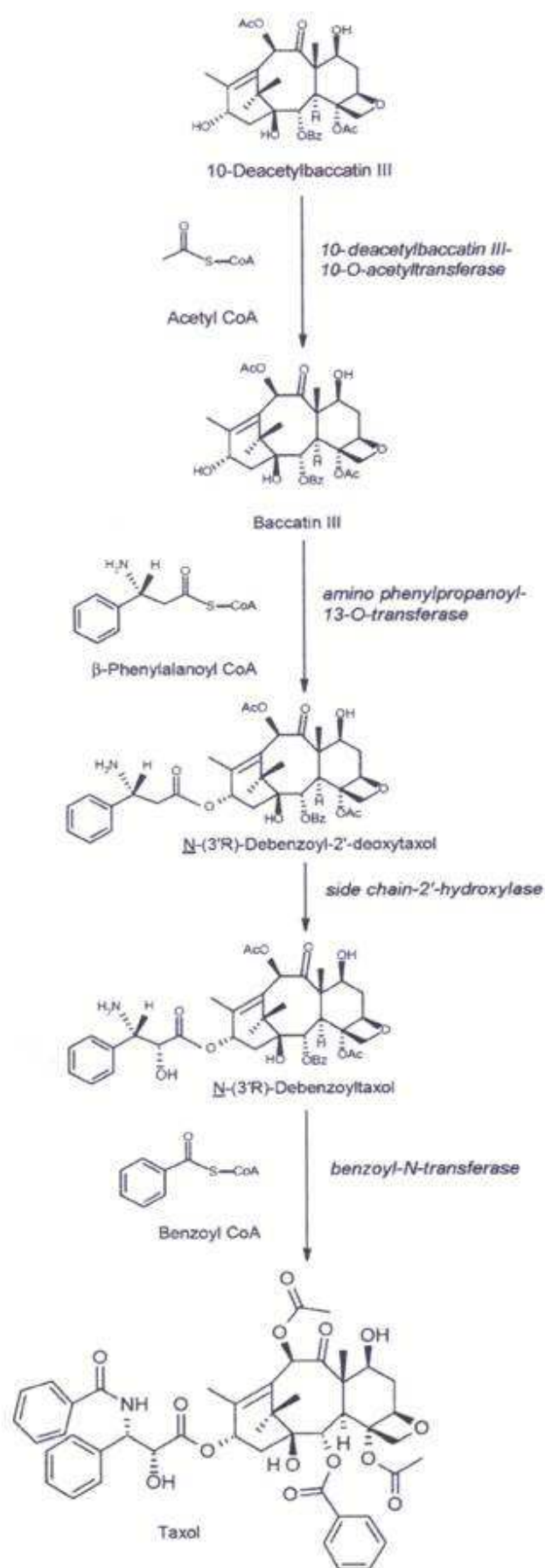
BIONDI et al. (2002) vo svojej analýze genetických variácií u Tisu západného uvádza, že možnosti pre genetickú selekciu pre vyvinutie zlepšených línií alebo kultivarov pre produkciu taxolu existujú, ale použitie súčasných domestikovaných druhov tisu je časovo i ekonomicky efektívnejšie.

SHIMOMURA et al. (1997) skúšali možnosť sušenia odrezkov *Taxus × media* 'Hicksii' v tenkých vrstvách. Parametre sušenia boli zisťované pri teplotách sušenia 30, 40, 50 a 60 °C. Výsledky ukazujú, že rýchlosť oproti najnižšej teplote narastala 3, 15 až 28 násobne. Najrýchlejšie usychali stopky, pomalšie ihličie a najpomalšie konáriky. Pri teplotách 40, 50 a 60 °C bola zhruba štandardná úroveň taxánov, pri sušení pri 30°C obsah klesal. Úroveň v ihličí vzrastala s narastajúcou teplotou sušenia, preto sa ako najoptimálnejšia teplota javí 60 °C.

Taxus x media 'Hicksii' bol ohodnotený ako jeden z najlepších prameňov taxolu a predstihoval ostatné odrody druhu *Taxus* (BOURGAUD et al, 2001).

Okrem *Taxus x media* 'Hicksii' sa zbieralo a hodnotilo mnoho iných odrôd. Príklad sústredenia taxolu a 10 - deacetylbaecatinu III v ihličí šiestich odrôd tisu je znázornený v tabuľke č. 3 (DORNENBURG, KNORR, 1996).

Zatiaľ čo najvyšší obsah taxolu bol izolovaný z odrody *Taxus x media* 'Hicksii' najvyšší obsah jeho predchodcu 10 – deacetylbaecatinu III sa izoloval z odrody *Taxus baccata* 'Repandens' (PARR et al., 1987).



Obr. č. 21 Biosyntéza taxolu

(<http://www.bristol.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol.htm>)

Tabuľka č.3 Koncentrácia Taxolu a jeho prekurzoru 10- deacetylbačatinu III, v šiestich odrodách *Taxus* (<http://www.bristol.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol.htm>)

Odroda	Koncentrácia	
	Taxol (mg/kg)	10- deacetylbačatin III (mg/kg)
<i>T. baccata</i> 'Repandens'	30	200
<i>T. brevifolia</i>	60	100
<i>T. canadensis</i>	90	20
<i>T. cuspidata</i> 'Capitata'	80	20
<i>T. x media</i> 'Densiformis'	20	70
<i>T. x media</i> 'Hicksii'	100	90

2.4 NOVÉ TECHNOLOGIE V PRODUKCII SEKUNDÁRNÝCH METABOLITOV

2.4.1 Explantátové techniky

K najintenzívnejšie sa rozvíjajúcim oblastiam rastlinných biotechnológií patrí manipulácia (genetická aj fyziologická) vyšších rastlín na úrovni izolovaných buniek, pletív a orgánov. Komplex metód založený na kultivácii *in vitro* – explantátové kultúry – predstavuje v súčasnosti moderný netradičný doplnok šľachtenia rastlín (SEMAN, 1990).

Šľachtiteľské biotechnológie vychádzajú z týchto základných princípov (NOVÁK, 1990):

- Veľké populácie buniek, z ktorých každá je potenciálnym zdrojom celého rastlinného organizmu, možno dlhodobo kultivovať a za kontrolovaných podmienok regenerovať z nich celistvé rastliny.
- Bunková kultúra je potenciálnym zdrojom genetickej variability, lebo rastlinné bunky *in vitro* sú geneticky a chromozomálne nestabilné. Genetickú nestabilitu možno zvýšiť použitím mutagénov v kultúre *in vitro*. Bunkové mutantné línie často nestrácajú totipotenciu, čo umožňuje dosiahnuť výraznú genetickú premenlivosť rastlín regenerovaných *in vitro*.
- Prejav znaku na bunkovej úrovni môže korelovať s prejavom toho istého znaku (alebo iného) na úrovni celého organizmu. Genetická informácia pre znaky a vlastnosti vyselektované *in vitro* sa prenáša po regenerácii rastlinného organizmu sexuálnou alebo vegetatívnu cestou na potomstvo.
- Kultúra organizovaných štruktúr rastlinného organizmu (zárodkov alebo meristémov) poskytuje systém pre udržanie vysokej genetickej stability materiálu. Kultivácia organizovaných štruktúr, najmä meristémov umožňuje hromadne množiť geneticky identické potomstvo nepohlavnou cestou – klonovať *in vitro*.

Pod pojmom „kultúra rastlinných explantátov *in vitro*“ treba rozumieť aseptickú kultiváciu izolovaných častí rastlín v umelých (laboratórnych) podmienkach. V experimentálnej praxi to znamená oddeliť zo sterilne vypestovanej alebo povrchovo sterilizovanej (dezinfikovanej) rastliny určitú časť, umiestniť ju do sterilného priestoru a kultivovať za viac-menej definovaných podmienok (KOVÁČ, 1995; PIERIK, 1997).

Pri rastlinnom organizme sa vychádza z toho, že každá živá bunka rastlinného organizmu je totipotentná, t.j. obsahuje kompletnú genetickú informáciu pre vývin celistvého organizmu. Priebeh morfogénézy vedúci k regenerácii rastlín v podmienkach *in vitro* je

rozhodujúci faktor ovplyvňujúci cytogenetické vlastnosti získaných jedincov. Genetická kontinuita prejavujúca sa stabilným diploidným karyotypom je zachovaná pri regenerácii rastlín *in vitro* z izolovaných rastových vrcholov (meristémová kultúra) alebo pri odvodení rastlín zo zygotových embryí v embryovej kultúre (NOVÁK, 1990).

Explantátové techniky na úrovni *in vitro* prinášajú oproti tradičnému prístupu tieto výhody (SEMAN, 1990):

- Možnosť vytvárania nových genotypov s takými kombináciami vlastností, ktoré nie je možné získať klasickou metódou hybridizácie.
- Schopnosť predbežnej selekcie genotypov so žiadanými znakmi už na určitej úrovni organizácie kultúry *in vitro*.
- Možnosť analýzy prípadných chimér a zníženie ich výskytu pri indukcii morfogénzy z jednej bunky.

Pri kultivácii rastlinných explantátov treba zabezpečiť predovšetkým sterilitu, pretože živné médiá heterotrofných organizmov v kultúre *in vitro* obsahujú organické látky a tak sa môžu kontaminovať mikroorganizmami, ktorých zárodky sa nachádzajú v ovzduší. Ďalšou podmienkou úspešnej kultivácie rastlinných explantátov *in vitro* je zabezpečenie vhodného zloženia živného média, vhodnej kultivačnej teploty a svetelných podmienok.

Z aspektu východiskového explantátu rozoznávame nasledujúce explantátové kultúry (BÖHMOVÁ a kol., 1988):

1. *Orgánové kultúry* - východiskový explantát je diferencovaný orgán,
 - embryokultúry,
 - peľnicové kultúry.
2. *Pletivové kultúry* – východiskový explantát je časť somatického pletiva,
 - meristémové kultúry (koreňové špičky, vegetačné vrcholy),
 - iné pletivá (šupiny cibúľ, kvetné časti, kambiálne pletivo).
3. *Bunkové kultúry* – východiskový explantát je izolovaná bunka.
4. *Protoplastové kultúry* – východiskový explantát je bunka, zbavená bunkovej steny.

Regenerácia rastlín *in vitro* a presadenie regenerantov do podmienok poľnej a skleníkovej kultúry umožnilo analyzovať spontánnu a indukovanú genetickú variabilitu systému *in vitro* na úrovni celého organizmu s následným využitím v šľachtení. Došlo tak k prepojeniu genetiky somatickej bunky s klasickou genetickou, t.j. hybridologickou analýzou (SEMAN, 1990).

2.4.2 Bunkové kultúry

Rastlinné bunkové kultúry sú atraktívnou alternatívnou možnosťou pre produkciu sekundárnych metabolitov (COLLIN, 2001; MISAWA, 1994; STAFFORD, 2002).

Rastlinné bunky sú biosynteticky totipotentné, čo znamená, že každá bunka v kultúre si zachováva kompletnú genetickú informáciu a je teda schopná produkovať tie isté chemické zlúčeniny, ktoré sa vyskytujú v materskej rastline. Výhody tejto technológie pred konvenčnými poľnohospodárskymi metódami sú nasledovné (RAO a RAVISHANKAR, 2002):

- je nezávislá od geografických zmien a rôznych environmentálnych faktorov,
- ponúka definovaný produkčný systém, ktorý zabezpečuje nepretržitú tvorbu produktov rovnakej kvality a výťažku a umožňuje produkciu nových zlúčením, ktoré sa bežne nevyskytovali v materskej rastline.

Spočiatku sa predpokladalo, že nediferencované bunky, ako sú kalusové kultúry alebo bunkové suspenzné kultúry, nie sú schopné produkovať sekundárne metabolity. Tieto tvrdenia vyvrátil ZENK so svojimi spolupracovníkmi (1991), keď v kalusovej kultúre *Morinda citrifolia* získali 2,5 g antrachinónu/l kultivačného média.

Bol podaný tiež priamy dôkaz o tom, že systém nediferencovanej bunkovej a pletivovej kultúry je mimoriadne vhodný pre rozšírenie genetickej premenlivosti rastlín a že vytvára možnosť selektovať na agronomicky prípadne farmakologicky významné vlastnosti na úrovni *in vitro* (BOUQUE a kol., 1998).

Existuje množstvo rastlinných bunkových kultúr, ktoré produkujú vyššie množstvá sekundárnych metabolitov ako produkujú intaktné rastliny (RAO a RAVISHANKAR, 2002).

Transfer buniek z celistvých rastlín až do bioreaktorovej kultúry zahŕňa niekoľko postupných krokov a často je to dlhodobá procedúra. Pre produkciu sekundárnych metabolitov tento proces začína výberom individuálnych rastlín na základe ich produktivity želanej zlúčeniny. Počas každého kroku procedúry musí byť produktivita pletív a buniek monitorovaná aby sa zabezpečil výber najproduktívnejších línií.

2.4.3 Orgánové kultúry

Pretože sa zistilo, že tvorba sekundárnych metabolitov je spravidla vyššia v diferencovaných rastlinných pletivách (BIONDI a kol., 2002), boli uskutočnené pokusy kultivovať v *in vitro* podmienkach celé rastlinné orgány, napr. výhonky alebo korene, s cieľom produkovať medicínsky dôležité zlúčeniny. Výhodou orgánových kultúr je relatívne vyššia stabilita produkcie sekundárnych metabolitov (RAO a RAVISHANKAR, 2002).

Pre účely produkcie sekundárnych metabolitov sa uvažuje všeobecne o dvoch druhoch orgánových kultúr: o koreňovej kultúre a výhonkovej kultúre (BOURGAUD a kol., 2001).

Koreňové kultúry môžu byť hodnotným zdrojom medicínálnych zlúčenín (FLORES a kol., 1999, YU a kol., 2002; SEVON a OKSMAN-CALDENTY, 2002). Nevýhodou koreňových kultúr sú však všeobecne pomalý rast a obtiažna spracovateľnosť (RAO a RAVISHANKAR, 2002). Z toho dôvodu sa hľadajú alternatívne metódy pre produkciu zlúčenín syntetizovaných v rastlinných koreňoch. Jednou z najperspektívnejších z nich je použitie kultúry vláskových koreňov (SEVON a OKSMAN-CALDENTY, 2002).

Vláskové korene sa získavajú po úspešnej genetickej transformácii rastlín baktériou *Agrobacterium rhizogenes*, ktorá prenáša časť svojho Ri (*root inducing*) plazmidu, tzv. T-DNA, do buniek hostiteľa. Tvorba vláskových koreňov je indukovaná auxínmi syntetizovanými v dôsledku prítomnosti génov pre ich syntézu na prenesenej T-DNA. Vlásokové korene majú jemnú štruktúru, rýchly rast, sú subkultivovateľné a je ich možné neobmedzene propagovať na živných médiách neobsahujúcich fytohormóny (CHILTON a kol., 1982; SEVON a OKSMAN-CALDENTY, 2002).

Okrem vhodných rastových charakteristík vykazujú kultúry vláskových koreňov zaujímavé vlastnosti z hľadiska produkcie sekundárnych metabolitov: ich profil metabolitov je totiž spravidla podobný alebo identický s profilom metabolitov v netransformovaných rastlinných koreňoch (PARR, HAMILL, 1987).

Dôležitou vlastnosťou vláskových koreňov, na rozdiel od bunkových suspenzných kultúr, je aj schopnosť produkcie sekundárnych metabolitov paralelne s rastom, t.j. možnosť získať kontinuálny zdroj sekundárnych zlúčenín z aktívne rastúcich vláskových koreňov (KIM a kol., 2002). Pre zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov v kultúre vláskových koreňov je možné použiť tie isté postupy, ktoré boli vyvinuté pre bunkové suspenzné kultúry, t.j. modifikácie zložiek živného média, aplikácia elicítorov, alebo prídavok prekurzorov metabolitov (BOURGAUD a kol., 2001).

Pre účely produkcie sekundárnych metabolitov je možné okrem koreňov použiť aj nadzemné časti rastlín, t.j. výhonky (BOURGAUD a kol., 2001; SMITH a kol., 2002; NOGUEIRA a ROMANO, 2002).

Výhonkové kultúry môžu byť geneticky transformované, keď sú získavané po infekcii baktériou *Agrobacterium tumefaciens*, alebo netransformované, keď sú pestované na kultivačných médiách vhodného hormonálneho zloženia (MASSOT a kol., 2000). Spoločnou vlastnosťou výhonkových kultúr s kultúrou koreňov a vláskových koreňov je genetická stabilita a dobrá kapacita pre produkciu sekundárnych metabolitov. Podobne ako pri kultúre vláskových koreňov aj výhonkové kultúry majú schopnosť produkovať sekundárne zlúčeniny súčasne s rastom. Nevýhodou výhonkových kultúr je relatívne pomalý rast, nutnosť pestovania výhonkových kultúr v podmienkach fotoperiód a niektoré odlišnosti v profile metabolitov, pretože niektoré biosyntetické dráhy sú lokalizované v špecializovaných orgánoch, napr. žľazách (BOURGAUD a kol., 2001).

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce je komplexné spracovanie poznatkov z vedeckých a odborných publikácií týkajúcich sa problematiky sekundárnych metabolitov, konkrétne rastlinných alkaloidov a ich využitie vo fytofarmácii. Bližšie sa chceme zamerať na alkaloid taxol získavaný z tisu. Keďže v súčasnosti na Slovensku neexistuje žiadna podrobnejšia vedecká publikácia zaoberajúca sa komplexným riešením problematiky získavania sekundárnych metabolitov, rozhodli sme sa pre spracovanie tejto problematiky.

4 MATERIÁL A METÓDY SPRACOVANIA

Pre naplnenie cieľa práce boli použité knižné publikácie učebnicového charakteru, monografické diela, vedecké a odborné časopisy domácej a zahraničnej proveniencie. Vzhľadom k aktualizácii údajov boli použité aj materiály uvedené na internetových stránkach.

Dokumentačný materiál, ktorý je použitý v tejto práci je k dispozícii v učebniciach a na internete.

Postup práce na plnení cieľov bol nasledovný:

1. zhromažďenie literatúry podľa štruktúry práce
2. excerpovanie myšlienok z literatúry a ich zostavovanie do komplexu štruktúry práce
3. vyhodnotenie excerpátu a doplnenie úvodných a záverečných častí prehľadu v zmysle metodiky písania záverečných prác

5 ZÁVERY

V rastlinách sa nachádza veľké množstvo sekundárnych metabolitov, ktoré sa syntetizujú a akumulujú ako odpoveď organizmu na napadnutie patogénom alebo reakcia na abiotický stres. Sekundárne metabolity majú mnohé biologické účinky, ktoré je možné uplatniť rôznymi spôsobmi v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Cieľom diplomovej práce bolo komplexné spracovanie poznatkov z vedeckých a odborných publikácií týkajúcich sa problematiky sekundárnych metabolitov, konkrétne rastlinných alkaloidov a ich využitie.

Sekundárne metabolity pochádzajú prevažne z metabolizmu cukrov a aminokyselín. Väčšina heterotrofných mikroorganizmov využíva glukózu ako základný zdroj uhlíka a energie. Niekoľko fungálnych metabolitov je odvodených priamo od glukózy, ale uhlík glukózy sa stáva použiteľný aj pre mnohé biosyntetické procesy pri tvorbe intermediátov v rade energií uvoľňujúcich reakcií. Ak sa intermediáty nepoužijú na syntetické účely, celkový výsledok reakčného poradía je oxidácia molekuly glukózy na CO_2 a vodu s produkciou 38 molekúl ATP. Disimilácia glukózy začína jej premenou na triózy Embdenovou-Meyerhofovou dráhou alebo pentózofosfátovým cyklom.

Expresiu metabolických dráh mnohých sekundárnych metabolitov je možné ľahko zmeniť pomocou vonkajších faktorov ako sú napr. množstvo živín, stresové faktory, svetlo a rastové regulátory. Veľa základných zložiek živných médií pre rastlinné bunkové kultúry je dôležitým ukazovateľom rastu a akumulácie sekundárnych metabolitov. Okrem chemických faktorov majú na odpoveď rastlinných buniek v *in vitro* kultúre veľký vplyv aj fyzikálne vlastnosti kultivačného prostredia, napr. intenzita osvetlenia, teplota, pH živného média a koncentrácia kyslíka v tekutých živných médiách.

Pre mnohé biologické účinky je možné sekundárne metabolity uplatniť rôznymi spôsobmi. Zistilo sa, že viacero sekundárnych metabolitov nájdených v rastlinách, má význam pri obrane organizmu proti herbivorom, škodcom a patogénom, pri ochrane pred UV žiarením. Môže ísť o využitie v potravinárskom priemysle vo forme aditív ako nutraceutík a preventívno-medicínskych prípravkov. Uplatnenie majú aj vo farmaceutickom priemysle, kde slúžia na výrobu preparátov, ktoré obsahujú tieto látky ako terapeuticky účinné substancie.

Alkaloidy majú význam v lekárstve a poľnohospodárstve. Ich výskyt je u mnohých druhov rastlín, a u niektorých húb a živočíchov. Existuje mnoho druhov alkaloidov s rôznymi účinkami. Najznámejšie sú tie s ktorými sa najčastejšie stretávame. Sú v známych rastlinách a hubách. Využitie je hlavne v medicíne či bylinárstve s čím súvisí aj ich ekonomický a historický význam. Z ekonomického hľadiska je to výroba liekov, ktorá je úzko spätá s

historickým predvojom. V minulosti totižto zohrávali veľkú úlohu účinky rôznych drog. Využívali sa v bojoch, pri šamanstve, a samozrejme aj na liečiteľské účely.

Bližšie sme sa zaoberali alkaloidom taxol získavaný z tisú. Tis západný (*Taxus brevifolia*) je najznámejším zdrojom širokého spektra sekundárnych metabolitov. Tis je biologická "starožitnosť", živá pamiatka na epochu treťohôr, preto má "čestné" miesto v súpisoch chránených druhov rastlín nielen na Slovensku, ale aj vo väčšine ďalších európskych štátov. Ihličky a kôra tisú obsahujú okrem jedovatých alkaloidov aj látku účinnú proti rakovine, ktorá sa nazýva taxol. Slovenská republika má v rámci Európy, ako jediná krajina, ucelenejšie a rozsiahlejšie pôvodné enklávy tohto druhu, čo predstavuje originálny selekčný súbor pre chemotypy s vysokým obsahom tejto látky.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. AGRIOS, G.N. 2005. Plant pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press, 2005, 922 pp. ISBN 0-12-044565-4.
2. BENNET, R. et al. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. In *New Phytologist*, vol. 127, 1994. p. 617– 633.
3. BIONDI, S. et al. 2002. Secondary metabolism in root and callus cultures of *Hyoscyamus muticus*. In *Plant Science*, vol. 163, 2002. p. 563- 569.
4. BIONDI, S., SCARAMAGLI, S., OKSMAN-CALDENTEY, K.M., POLI, F. 2002. Secondary metabolism in root and callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L.: the relationship between morphological organisation and response to methyl jasmonate. *Plant Science*, 163, 2002, s. 563-569.
5. BÖHMOVÁ, B. 1988. Genetické základy rastlinného šľachtiteľstva. Univerzita Komenského, Bratislava, 1988, s.55-57.
6. BOURGAUD, F. et al. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. In *Plant Science*, vol. 161, 2001. p. 839- 851.
7. BOUQUE, V., BOURGAUD, F., NGUYEN, C., GUCKERT, A. 1998. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 1998, s. 35-40.
8. BRESTIČ, M., OLŠOVSKÁ, K., 2001. Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. 1. vyd. SPU v Nitre, 2001. 149 s. ISBN 80-7137-902-6.
9. COLLIN, H. 2000. Secondary product formation in plant tissue cultures. In *Plant Growth Regulation*, vol. 34, 2001. p. 119- 134.
10. DONG, H.D., ZHONG, J.J. 2001. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 2001, s. 145-150.
11. DORNENBURG, H., KNORR, D. 1996. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Science* 15: 141–168.
12. DUŠEK, J., DUŠKOVÁ, J. 1997. Explantátové kultúry vyšších rastlín a jejich využití v biotechnologii. In *Naše liečivé rastliny*, roč.34, 1997. č. 5. 164 - 168 s.
13. FILOVÁ, A., MIKLÁŠOVÁ, K., SKRZYPEK, E. 2007. ACF02 Faktory ovplyvňujúce kvalitu a distribúciu taxolu v explantátových kultúrach tisu (*Taxus* spp.). 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2007. 492-497 s. ISBN 978-80-87011-00-3.

14. FILOVÁ, A., ROVNÁ, K. 2007. Using of plant *in vitro* cultures for producing secondary metabolites. In *Acta Biochimica Polonica*, 2007. 35 s. ISSN 0001-527X-311113.
15. FLORES, H.E., VIVANCO, J.M., LOYOLA-VORGAS, M. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science*, 4, 1999, s. 220-226.
16. GRAYER, R.J., HARBONE, J.J. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry*, 37, 1994, s. 19-42.
17. HAGIMORI, M., MATSUMOTO, T., OBI, Y. 1982. Studies on the production of *Digitalis purpurea* cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiology*, 69, 1982, s. 653-656.
18. HALL A.E. 2001. Crop responses to environment. CRC Press, 2001, 232 s. ISBN 0-8493-1028-8
19. CHARLWOOD, B.V. et al. 1990. Accumulation of secondary compounds organised plant cultures. In *Secondary products from plant tissue culture* (eds.) B.V. Charlwood & M.J.C. Rhodes. Clarendon Press. Oxford.
20. CHILTON, M.D. et al. 1982. Agrobacterium inserts T-DNA into genome of the host plant root cells. In *Nature*, vol. 295, 1982. p. 432- 433.
21. JANÍK, A., DUŠEK, K. 1990. *Drogy a společnost*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1990. 344 s.
22. JENKS, M.A., HASEGAWA, P.M. 2005. *Plant abiotic stresses*. Blackwell Publishing, 2005, 270 pp. ISBN 1-4051-2238-2.
23. KAMENICKÁ, A., VIZÁROVÁ, G. 2000. *Mikromnožení okrasných dřevín*. 1. vyd. Nitra : SPU, 2000. 63 s. ISBN 80-7137-725-2.
24. KIM, Y. et al. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. In *In vitro cellular and developmental biology-Plant*, vol. 38, 2002. p. 1- 10.
25. KOVÁČ, J. 1995. *Explantátové kultury rostlin*. Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, 1995, 142 s., ISBN 80-7067-493-8
26. KRESÁNEK, J. 1988. *Atlas léčivých rostlín a lesných plodov*. 3. vyd. Martin: Osveta, 1988. 398 s.
27. KUČ, J.: Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 33, 1995, s. 275-297.
28. KUTINA, J. 1987. *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1987, 416 s., ISBN 07-028-88

29. LICHTENTHALER, H.K. 1996. Vegetation stress. Springer Verlag Berlin, 1996, 921 s.
30. MASAROVIČOVÁ, E., REPČÁK, M. 2002. Fyziológia rastlín. Bratislava: UK, 2002. 304 s. ISBN 80-223-1615-6.
31. MASSOT, B. et al. 2000. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. In Plant Cell, Tissue and Organ culture, vol. 62, 2000. p. 11- 19.
32. MEYER, H., VAN STANDEN, J. 1997. The *in vitro* production of an anthocyanin from cyklus cultures of *Oxalica linearis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40, 1997, s. 51-287.
33. MISAWA, M. 1994. Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites. FAO Agricultural Services Bulletin, 108, 1994, 1-87.
34. MOK, M. 1976. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Dacus carota*. Journal of the American Society for Horticultural Sciences, 101, 1976, s. 422-429.
35. MULDER-KRIEGER, T., VERPOORTE, R., SVENDSE, A., SCHEFFER, J. 1988. Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 13, 1988, s. 85-114.
36. NĚMEC, B., PASTÝRIK, Ľ. 1963. Všeobecná botanika. Bratislava: Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, 1963. 861 s.
37. NOGUEIRA, J.M.F., ROMANO, A. 2002. Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. Phytochemical Analysis, 13, 2002, s. 4-7.
38. NOVÁK, F. 1990. Explantátové kultúry a jejich využití ve šlechtění rostlin. 1. vyd. Praha: Academia, 1990. 208 s. ISBN 80-200-0344-4.
39. NOVÁK, J. 2007. Jedovaté rostliny kolem nás. 1. vyd. Praha: TAVA Graphical, 2007. 176 s. ISBN 978-80-247-1549-0.
40. ONDRUŠ, D. 1983. Toxikománia strašiak či hrozba?. Martin: Osveta, 1983. 76 s.
41. OSBOURN, A.E. 1999. Antimicrobial phytoprotectant and fungal pathogens: A commentary. Fungal Genet. Biol., 26, 1999, s. 163-168.
42. OSBOURN, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell, 8, 1996, s. 1824-1831.
43. PARR, A.D., HAMILL, J.D. 1987. Relationship between *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root and intact, uninfected *Nicotiana* plants. Phytochemistry, 26, 1987, s. 3241-3245.
44. PASTÝRIK, Ľ. 1979. Fyziológia rastlín. 1. vyd. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1979. 312 s.

45. PIERIK, R.L.M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht –Boston – London, 1997, 348 s., ISBN 0-7923-5267-X
46. POLLOCK, C.J., FARRAR, J. F., GORDON, A.J. 1992. Carbon Partitioning within and between organisms. BIOS Scientific Publishers, 1992. p. 258, ISBN 1872748953.
47. RAJASEKARAN, T., RAVISHANKAR, G.A., VENKATARAMAN, L.V. 1991. Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Current Science, 60, 1991, s. 705-707.
48. RAJENDRAN, L., RAVISHANKAR, G.A., VENKATARAMAN, L.V., PRATHIBA, K.R. 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Dacus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. Biotechnology Letters, 14, 1992, s. 707-714.
49. RAO, S.M. et al. 1988. Chemical factories of secondary metabolites. In Biotechnology Advances, vol. 20, 1988. p. 93- 104.
50. ROMAGNOLI, L.G., KNORR, D. 1988. Effect of ferulic acid treatment on growth and flavour development of cultured *Vanilla planifoliacells*. Food Biotechnology, 2, 1988, s. 93-104.
51. SAHAI, O., SHULER, I. 1984. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1984, s.111- 120.
52. SEITZ, H.U., HINDERER, W. 1988 Anthocyanins. In: CONSTABEL, F. – VASIL, I. Eds.): Cellculture and somatic cell genetics of plants, Vol. 5. Academic Press, San Diego, USA, 1988, s. 49-76.
53. SEMAN, I. 1990. Biotechnologické metódy v šľachtení poľných plodín. Príroda, Bratislava, 1990, 269 s.
54. SEVON, N. et al. 2002. Agrobacterium rhizogenes- mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. In Planta Medica, vol. 68, 2002. p. 859- 868.
55. SHIMOMURA, K. et al. 1997. Traditional medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. In Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity, 1997. p. 209- 225.
56. SMIRNOFF, N. 1995. Environment and Plant Metabolism. Bios Scientific Publishers, 1995. p. 270, ISBN 187278937
57. SMITH, C.J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. New Phytopathol., 132, 1996, s. 1-45.
58. STAFFORD, A.M. 2002. Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. Current Opinion in Drug Discovery and Development, 5, 2002, s. 296-303

59. SULEMAN, P., TOHAMY, A.M., SALEH, A.A., MADKOUR, M.A., STRANEY, D.C. 1996. Variation in sensitivity to tomatine and rishitin among isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, and strains not pathogenic to tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 48, 1996, s. 131-144.
60. ŠKÁRA, B., FERENČÍK, M. 1983. *Biochémiá*. 2.vyd. Bratislava: ALFA, 1983. 740 s. ISBN 063-576-87-03.
61. ŠVIHRA, J. A KOL. 1989. *Fyziológia rastlín*. Bratislava: Príroda, 1989. 348 s. ISBN 80-07-00049-6.
62. TABATA, M., FUJITA, Y. 1985. Production of shikonin by plant cell cultures. In: DAY, P., ZEITLIN, M., HOLLAENDER, A. (Eds.): *Biotechnology in Plant Science*. Orlando, Academic Press, 1985, s. 207-218.
63. VAN ETTEN, H.D., MANSFIELD, J.W., BAILEY, J.A., FARMER, E.E.: Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell*, 6, 1994, s. 1191-1192.
64. VODRÁŽKA, Z. 1992. *Biotechnologie*. 1.vyd. Praha : Academia, 1992. 212 s. ISBN 80-200-0293-6.
65. VOET, D., VOETOVÁ, J.G. 1990. *Biochemie*. Victoria publishing Praha, 1990. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
66. WINK, M. 1999. *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Sheffield Academic Press, 1999. p. 358, ISBN 1-84127-007-5.
67. YU, K.W., GAO, W.Y., HAHN, E.J., PAEK, K.Y. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biochemical Engineering Journal*, 11, 2002, s. 211-215.
68. YUAN, Y.J., WEI, Z.J., WU, Z.L., WU, J.C. 2001. Improved Taxol production in suspensioncultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* by in situ extraction combined with precursorfeeding and additional carbon source introduction in an airlift loop reactor. *BiotechnologyLetters*, 23, 2001, s. 1659-1662.
69. ZENK, M. H. 1991. Chasing the enzymes of secondary metabolisms: plant cultures as a pot of gold. In *Phytochemistry*, vol. 30, 1991. p. 3861- 3863.

Verejná počítačová sieť INTERNET:

<http://referaty-seminarky.sk/metabolizmus-sacharidov/>

(<http://www.gsurba.sk/pk/bio/texty/krebsovcyklus.pdf>)

http://is.muni.cz/th/150559/prif_b/EVrecnikova.pdf

http://www.plantae.sk/carnivorous/info/metabolity_drosera.htm

<http://images.google.sk/imgres?imgurl=http://kekule.science.upjs.sk/ekologia>

http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_05_406-414.pdf

http://referaty.atlas.sk/prirodne_vedy/chemia/6402/?page=1

http://www.gymjsbj.sk/texts/web_chemia/download/alkaloidy.doc

<http://www.byliny.sk/>

<http://referaty.hladas.sk/referat.php/-alkaloidy/14/1142>

<http://www.bristol.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol.htm>

<http://www.garten.cz/e/sk/1031-tis-obycajny-taxus-baccata>

http://referaty.atlas.sk/prirodne_vedy/chemia/21439/?page=0

<http://referaty.atlas.sk/prirodne-vedy/chemia/50908/fenoly-a-ich-vplyv-na-zivotne-prostredie-a-cloveka>

7 Prílohy

1. CD médium – diplomová práca v elektronickej podobe, prílohy v elektronickej podobe.
2. Kalusové kultúry.

Príloha 2

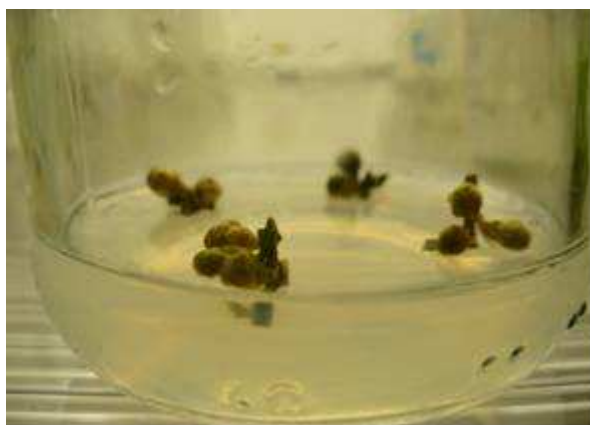
Kalusové kultúry



OBR. 1.:
KALUSOVÁ KULTÚRA *T. BACCATA*
NA WV1 MÉDIU



OBR. 2.:
KALUSOVÁ KULTÚRA *T. CUSPIDATE*
NA WV2 MÉDIU



OBR. 3:
KALUSOVÁ KULTÚRA *T. BACCATA*
V PROCESSE REGENERÁCIE (FILOVÁ, ROVNÁ, 2007).